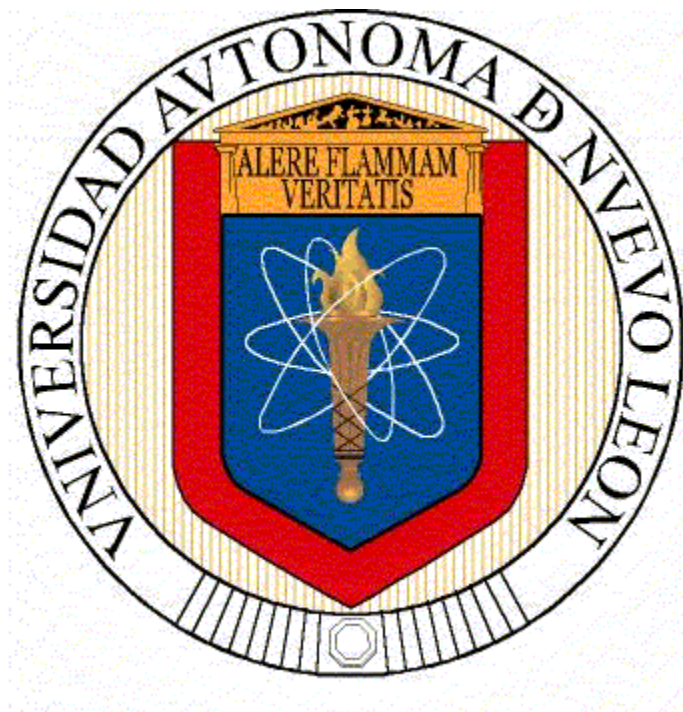


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



**TESIS**

**CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES EN DOS  
ESPECIES DE *PETROSELINUM* CON DIFERENTES TRATAMIENTOS  
TÉRMICOS.**

**Por:**

**LNCA. MYRIAM LIZETH DELGADO FLORES**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

**MONTERREY, NUEVO LEÓN SEPTIEMBRE DE 2015**



**UANL**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



**FaSPyN**

Facultad de Salud Pública y Nutrición

**TESIS**

**CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES EN DOS  
ESPECIES DE *PETROSELINUM* CON DIFERENTES TRATAMIENTOS  
TÉRMICOS.**

**PRESENTA**

**LNCA. MYRIAM LIZETH DELGADO FLORES**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

**MONTERREY, NUEVO LEÓN**

**SEPTIEMBRE DE 2015**



**UANL**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



**FaSPyN**

Facultad de Salud Pública y Nutrición

**CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES EN DOS  
ESPECIES DE *PETROSELINUM* CON DIFERENTES TRATAMIENTOS  
TÉRMICOS.**

**Por:**

**LNCA. MYRIAM LIZETH DELGADO FLORES**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

**Septiembre, 2015**



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**Dr. en C.S. Esteban Gilberto Ramos Peña**  
**Subdirector de Investigación Innovación y Posgrado**  
**Facultad de Salud Pública y Nutrición de la UANL**  
**P R E S E N T E:**

Estimado Dr. Ramos Peña, por este conducto le comunicamos que hemos concluido la dirección y codirección de la tesis titulada: **“CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES EN DOS ESPECIES DE *PETROSELINUM* CON DIFERENTES TRATAMIENTOS TÉRMICOS”**. Presentada por la **LNCA Myriam Lizeth Delgado Flores** con la finalidad de obtener su grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Sin otro asunto en particular, le enviamos un cordial saludo.

Atentamente

“Alere Flammam Veritatis”

Monterrey, Nuevo León a 28 de Septiembre de 2015


Dra. Blanca Edelia González Martínez  
Director de Tesis

MC. Manuel López-Cabanillas Lomeli  
Co-Director de Tesis

COMITÉ DE EVALUACIÓN DE TESIS

**CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES EN DOS  
ESPECIES DE *PETROSELINUM* CON DIFERENTES TRATAMIENTOS  
TÉRMICOS.**

**Comité de Evaluación de Tesis**



**PRESIDENTE**

MC. Manuel López-Cabanillas Lomelí



**SECRETARIO**

Dra. Blanca Edelia González Martínez



**VOCAL**

Dr. Jesús Alberto Vázquez Rodríguez



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**Dr. en C.S. Esteban Gilberto Ramos Peña**  
**Subdirector de Investigación Innovación y Posgrado**  
**Facultad de Salud Pública y Nutrición de la UANL**  
**P R E S E N T E:**

Estimado Dr. Ramos Peña, por este conducto le comunicamos que se han atendido las recomendaciones realizadas por los revisores de la tesis titulada: **“CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES EN DOS ESPECIES DE *PETROSELINUM* CON DIFERENTES TRATAMIENTOS TÉRMICOS”**. Presentada por la **LNCA Myriam Lizeth Delgado Flores** con la finalidad de obtener su grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Sin otro asunto en particular, le enviamos un cordial saludo.

Atentamente

“Alere Flammam Veritatis”

Monterrey, Nuevo León a 28 de Septiembre de 2015

Dra. Blanca Edelia González Martínez  
Director de Tesis

MC. Manuel López-Cabanillas Lomelí  
Co-Director de Tesis

## **LUGARES DE TRABAJO**

La presente tesis se desarrolló en los Laboratorios del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública de la Universidad Autónoma de Nuevo León:

- Laboratorio de Alimentos.
- Laboratorio de Bioquímica Nutricional.
- Laboratorio de Genética y Biología Molecular.
- Laboratorio de Proteómica.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al finalizar un trabajo es inevitable sentir felicidad y orgullo al hacer un aporte científico. Sin embargo, la magnitud de este aporte hubiese sido imposible sin la participación de personas e instituciones que me han facilitado para un feliz término de este trabajo. Por lo que es un placer utilizar este espacio para dar reconocimiento y expresar mi más sincero agradecimiento.

Primeramente deseo mostrar mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Nuevo León por contribuir en la continuación de mi formación profesional.

Un agradecimiento especial a la Dra. Blanca Edelia González Martínez. Para mí es un honor realizar este trabajo bajo su dirección y siempre le estaré agradecida por el apoyo, confianza en mi trabajo, su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, al igual que su tiempo. También me gustaría agradecer a mis profesores durante toda mi formación porque todos han aportado con un granito de arena al término de este trabajo.

A todas las personas que de algún modo contribuyeron a la culminación de este trabajo de investigación y a mis compañeras que han vivido conmigo la realización de esta tesis, gracias por su apoyo, colaboración, ánimo y especialmente su amistad.

Es imposible no mencionar el gran apoyo que me brindaron mis compañeros de laboratorio, principalmente Abad Arturo López Hernández, Gerardo Ismael Arredondo Mendoza y Ana Sofía Ortega Villarreal.

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de estos años, por ser mi fortaleza en los momentos débiles y brindarme esta oportunidad llena de aprendizaje, experiencia y felicidad.



## TABLA DE CONTENIDO

	Página
<b>1 RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2 INTRODUCCION.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Planteamiento del problema.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Justificación.....</b>	<b>6</b>
<b>3 HIPÓTESIS.....</b>	<b>8</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>8</b>
<b>4.1 Objetivo General.....</b>	<b>8</b>
<b>4.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>8</b>
<b>5 ANTECEDENTES.....</b>	<b>9</b>
<b>5.1 El perejil.....</b>	<b>9</b>
5.1.1 Efectos benéficos del perejil.....	11
5.1.2 Compuestos químicos en el perejil.....	12
<b>5.2 Polifenoles.....</b>	<b>15</b>
<b>5.3 Flavonoides.....</b>	<b>16</b>
5.3.1 Funciones de los flavonoides en las plantas.....	19
5.3.2 Apigenina.....	20
5.3.3 Absorción intestinal de flavonoides.....	22
5.3.4 Efecto del tratamiento térmico sobre los flavonoides.....	24
5.3.5 Cuantificación de flavonoides.....	26
<b>6 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
<b>6.1 Metodología.....</b>	<b>28</b>
<b>6.2 Material biológico.....</b>	<b>30</b>
<b>6.3 Métodos de obtención de los extractos.....</b>	<b>31</b>
6.3.1 Tratamiento térmico por inmersión (agua destilada a 100 °C) de las dos especies de perejil ( <i>P. crispum</i> y <i>P. sativum</i> ).....	<b>31</b>
6.3.2 Tratamiento térmico con vapor de las dos especies de perejil ( <i>P. crispum</i> y <i>P. sativum</i> ).....	<b>31</b>
6.3.3 Separación de los extractos.....	<b>32</b>

6.3.4 Obtención de las dos especies de perejil ( <i>P. crispum</i> y <i>P. sativum</i> ) en estado de senescencia.....	33
<b>6.4 Determinación de humedad.....</b>	<b>33</b>
<b>6.5 Pruebas fitoquímicas coloridas para identificación de grupos funcionales.....</b>	<b>34</b>
<b>6.6 Determinación de compuestos fenólicos totales.....</b>	<b>36</b>
<b>6.7 Cuantificación de flavonoides totales.....</b>	<b>37</b>
<b>6.8 Identificación y cuantificación de flavonoides por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....</b>	<b>39</b>
6.8.1 Curva de calibración de las soluciones estándar.....	39
6.8.2 Análisis de flavonoides por HPLC.....	39
6.8.3 Hidrólisis de glicósidos de polifenoles.....	40
6.8.4 Cuantificación de kaempferol y apigenina con estándar interno.....	41
<b>6.9 Análisis estadístico.....</b>	<b>41</b>
<b>7 RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
<b>7.1 Obtención y rendimiento de extractos.....</b>	<b>43</b>
<b>7.2 Determinación de humedad.....</b>	<b>43</b>
<b>7.3 Grupos funcionales presentes en <i>P. crispum</i> y <i>P. sativum</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>7.4 Contenido de compuestos fenólicos en extractos de perejil....</b>	<b>45</b>
7.4.1 Efecto de tiempo de calentamiento en el contenido de polifenoles totales.....	47
7.4.2 Efecto de tiempo de calentamiento en el contenido de flavonoides totales.....	50
7.4.3 Efecto de la senescencia en los compuestos fenólicos.....	53
7.4.4 Identificación y cuantificación de flavonoides por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	54
7.4.4.1 Estandarización del método de cuantificación de flavonoides.....	54
7.4.4.2 Análisis de flavonoides por HPLC.....	56
7.4.4.3 Hidrólisis de glicósidos de polifenoles.....	58

7.4.4.4 Cuantificación de apigenina.....	59
7.4.5 Efecto de la senescencia en el contenido de apigenina.....	60
<b>8 DISCUSION.....</b>	<b>61</b>
8.1 Contenido de humedad.....	61
8.2 Contenido de polifenoles.....	62
8.3 Contenido de flavonoides totales.....	62
8.4 Identificación de los principales flavonoides en perejil.....	64
8.5 Efecto del tratamiento térmico en compuestos fenólicos.....	65
8.6 Efecto de la senescencia en el contenido de compuestos fenólicos.....	68
<b>9 CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>10 LITERATURA CITADA.....</b>	<b>72</b>
<b>11 ANEXOS.....</b>	<b>86</b>
Anexo A. Curvas de calibración.....	93
Anexo B. Cromatogramas de los diferentes tratamientos.....	95

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Clasificación botánica del perejil.....	9
2. Componentes bioactivos e importancia medicinal (probadas y/o presuntiva) aislada de <i>Petroselinum crispum</i> .....	14
3. Componentes bioactivos e importancia medicinal (probadas y/o presuntiva) aislada de <i>Petroselinum sativum</i> . ....	15
4. Análisis realizados a los extractos de los diferentes tratamientos.....	30
5. Condiciones de flujo del HPLC.....	40
6. Porcentaje de rendimiento del extracto líquido. ....	43
7. Determinación de humedad <i>P. sativum</i> y <i>P. crispum</i> . ....	44
8. Contenido de grupos funcionales en <i>P. sativum</i> y <i>P. crispum</i> en extracto líquido. ....	45
9. Polifenoles y flavonoides totales en dos especies de perejil fresco. ....	46
10. Polifenoles y flavonoides totales en dos especies de perejil con tratamiento térmico (un minuto a 100 °C).....	46
11. Polifenoles totales de <i>P. sativum</i> y <i>P. crispum</i> en el extracto líquido ....	48
12. Polifenoles totales de <i>P. sativum</i> y <i>P. crispum</i> en el extracto sólido. ....	49
13. Flavonoides totales de <i>P. sativum</i> y <i>P. crispum</i> en el extracto líquido. ....	51
14. Flavonoides totales de <i>P. sativum</i> y <i>P. crispum</i> en el extracto sólido.....	52
15. Efecto de la senescencia en el extracto líquido. ....	53
16. Efecto de la senescencia en el extracto sólido. ....	54

17.	Curvas de calibración y coeficientes de regresión de loesestándares. ....	55
18.	Tiempo de retención, límites de detección y cuantificación de los estándares de compuestos fenólicos. ....	55
19.	Cuantificación de compuestos fenólicos en las especies de perejil por tratamiento térmico por inmersión a 100 °C durante un minuto.....	57
20.	Contenido de apigenina en <i>P. sativum</i> y <i>P. crispum</i> . ....	59
21.	Efecto del contenido de apigenina del perejil en senescencia.....	60

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura general de los flavonoides .....	17
2. Estructura de los flavonoides .....	18
3. Estructura de apigenina en forma de aglicona (apiina) y dos glucosidos .....	21
4. Estructura de flavonoides (a) glicosido flavonoide y (b) aglicona flavonoide. ....	22
5. Esquema general de análisis. ....	29
6. Especies de perejil consumidas en México.....	31
7. Determinación de compuestos fenólicos totales.....	37
8. Cuantificación de flavonoides totales.....	38
9. Hidrólisis de glicósidos de polifenoles.....	41
10. Cromatograma de estándares flavonoides.....	56
11. Cromatograma de estándar de apigenina y kaempferol.....	56
12. Cromatograma de <i>P. crispum</i> sin hidrólisis por tratamiento térmico por inmersión durante un minuto a 100 °C. ....	58
13. Cromatograma de <i>P. crispum</i> con hidrólisis por tratamiento térmico por inmersión durante un minuto a 100 °C. ....	58

## LISTA DE SÍMBOLOS O NOMECLATURA

<b>Etanol</b>	Etanol
<b>FD</b>	Reactivo de Folin-Denis
<b>g</b>	Gramo
<b>GA</b>	Ácido Gálico (Gallic Acid)
<b>h</b>	Hora
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución (High performance liquid chromatography)
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad (Low density lipoproteins)
<b>LNCA</b>	Licenciado en nutrición y ciencia de los alimentos
<b>mg</b>	Miligramo
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Carbonato de sodio
<b>No.</b>	Número
<b>pH</b>	Potencial de hidrogeno
<b>pKa</b>	Constante de disociación ácida
<b>S.A. de C.V.</b>	Sociedad Anónima de Capital Variable
<b>S/N</b>	Sin número
<b>UV</b>	Ultra violeta
<b>µg</b>	Microgramos
<b>µL</b>	Microlitros
<b>v/v</b>	Volumen/volumen (de concentración)
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>%</b>	Porcentaje
<b>#</b>	Signo de número

## 1 RESUMEN

En México se consumen dos especies de perejil (*Petroselinum crispum* y *Petroselinum sativum*), los cuales contienen diferentes compuestos bioactivos entre los que destacan los flavonoides (apíina, luteolina, apigenina y algunos glucósidos), aceites esenciales (apiol y miristicina), cumarinas (bergapteno, imperatorina, xantotoxina, trioxaleno y angelicina). Estos compuestos fenólicos han demostrado efectos antioxidantes en investigaciones *in vitro* y se observó el papel importante en la prevención de la patogénesis de algunas enfermedades y su interacción en la inhibición o disminución de radicales libres. La apigenina, el flavonoide mayoritario del perejil, tiene capacidad de inhibir mutaciones en las células de mama, riñón y próstata y efectos antiproliferativos en cáncer de colon, pulmón y melanoma de acuerdo a reportes científicos. Existe evidencia de que los compuestos fenólicos sufren cambios que afectan su biodisponibilidad por acción del calor, también existen reportes de que el calor potencializa el contenido de polifenoles en algunos alimentos, no existe información científica sobre las especies de perejil producidos y consumidos en México, los flavonoides que contienen y sus mecanismos de acción y las características estructurales de los compuestos bioactivos, requeridas para demostrar sus actividades biológicas. Por lo que es pertinente investigar si las especies de perejil que se consumen en nuestro país contienen los compuestos que han sido reportados en otras variedades. **Objetivo:** Caracterizar y cuantificar el contenido de flavonoides en dos especies de perejil (*Petroselinum sativum* y *Petroselinum crispum*) cultivadas en México y evaluar el efecto causado por tratamientos térmicos. **Métodos:** Se analizaron dos especies de perejil fresco y 12 días después (estado de senescencia). El perejil fresco se sometió a dos tratamientos térmicos: a) inmersión (agua destilada a 100 °C) y se tomaron muestras a 1, 5, 15 y 30 minutos y b) cocción a vapor durante 5, 15 y 30 minutos, como control se estudió el perejil sin ningún tratamiento (0 minutos). Las pruebas que se realizaron fueron la determinación de polifenoles totales, flavonoides totales, pruebas fitoquímicas coloridas para la identificación de grupos funcionales y la identificación y cuantificación de flavonoides por HPLC. **Resultados:** El



contenido de polifenoles, flavonoides y apigenina se encontró principalmente en el extracto líquido debido a que se encontraban en forma de glucósidos los cuales son solubles en agua. Entre las especies de perejil en estado fresco se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el contenido de flavonoides totales y apigenina pero no de polifenoles totales. En los productos en estado de senescencia no se encontró diferencia significativa entre las especies en el contenido de polifenoles y flavonoides totales, pero si en el contenido de apigenina. El flavonoide mayoritario en las dos especies de perejil fue la apigenina. Se observó que los tratamientos térmicos aumentan el contenido de compuestos fenólicos, los tiempos prolongados de calor reducen el contenido de estos compuestos bioactivos. Al comparar los tratamientos térmicos se encontró que el mayor incremento de polifenoles, flavonoides y apigenina en el tratamiento térmico por inmersión en agua durante un minuto, siendo mayor en la especie *Petroselinum crispum* respecto a la muestra control (3 veces en polifenoles totales, 19 veces en flavonoides totales y 135 veces en apigenina).

**Conclusión:** Al comparar el contenido de polifenoles totales de las especies de perejil estudiada con investigaciones de otros países se encontró que el *P. crispum* presenta un mayor contenido de polifenoles y flavonoides. Los flavonoides en las dos especies de perejil se encuentran en forma de glicósidos principalmente de apigenina. Por último, podemos deducir que los métodos de cocción tienen capacidad de incrementar el contenido de compuestos fenólicos en el perejil.

## 2 INTRODUCCIÓN

Recientemente se ha puesto especial atención en las plantas comestibles que son ricas en metabolitos secundarios (fitoquímicos) y existe un especial interés en la actividad antioxidante de estos metabolitos y su incorporación a la dieta (Kamel, 2013).

Rietjens (2002) considera como antioxidantes naturales a los flavonoides y polifenoles, junto a las vitaminas A, C, E y a los carotenoides, reconociéndolos como componentes benéficos de las frutas y hortalizas. En el mismo estudio propone la utilización de estos antioxidantes naturales como ingredientes funcionales en los alimentos y como complementos alimenticios.

En una investigación *in vitro* de los efectos antioxidantes del perejil, se observó el papel importante de sus compuestos fenólicos en la prevención de la patogénesis de algunas enfermedades asociadas a la digestión, estómago, riñones, sangre, hígado y sistema nervioso central, además de su interacción en la inhibición o disminución de radicales libres (Fejes et al., 1998).

Boldizsár, Füzfa y Molnár-Perl (2013) afirman que en algunos lugares el perejil se considera como un alimento funcional debido a las propiedades que le confieren sus compuestos fenólicos y por lo tanto se les da un uso farmacológico. Kreydiyyeh y Usta (2002) encontraron estos compuestos en *Petroselinum sativum* reportaron la presencia de flavonoides, ácido petroselínico, aceites esenciales y cumarinas, además de vitaminas y minerales, Moazed, Mirzaie, Seyyednejad, Zadkarami y Amirzargar (2007) en *Petroselinum crispum*.

*Petroselinum crispum* es una hierba popular ampliamente utilizada en varias regiones por sus aplicaciones como condimento, ingrediente en ensaladas frescas, té de hierbas, agente aromático en alimentos, así como usos en farmacéutica, perfumería y cosmética e industrias alimentaria (Tian et al., 2011).

Actualmente el perejil es utilizado ampliamente como condimento, sus hojas rizadas son usadas para aderezo y saborizante de carnes, salchichas, en alimentos enlatados, sopas, salsas, incluso como aromatizante de quesos y diversos tipos de alimentos (Grüner, Reinhold y Gil, 2008).

Existen especies de perejil ampliamente aceptadas y utilizadas en México (Munguia, Cuevas y Martinez, 2012), sin embargo, la documentación científica sobre el conocimiento de los flavonoides, sus mecanismos de acción y las características estructurales de los compuestos bioactivos, requeridas para demostrar las actividades biológicas en el perejil producido y consumido en México es pobre.

Por lo que es necesario investigar si las especies de perejil que se consumen en nuestro país contienen los compuestos que han sido reportados en otras especies y si los tratamientos térmicos usados comúnmente en la preparación de los alimentos, afectan a estos polifenoles lo que podría llevar a modificar la absorción a nivel intestinal y por ende sus efectos benéficos.

En este trabajo dos diferentes especies de perejil encontradas en México (*Petroselinum sativum* y *Petroselinum crispum*) fueron sometidas a diferentes tratamientos térmicos y se analizó el efecto de los tratamientos en el contenido de componentes fenólicos que pueden aportar beneficios a la salud.

## **2.1 Planteamiento del problema**

Entre los primeros recursos para la medicina tradicional se encuentran las plantas, estas conforman un grupo que ha sido de gran relevancia en la utilización como remedios para diversas enfermedades (Munguia et al., 2012; Fonnegra y Jiménez, 2007).

Se han identificado y cuantificado numerosos compuestos químicos que contiene el perejil, algunos de ellos, los flavonoides (agliconas, glucósidos y

ácidos fenólicos) con actividades biológicas deseables como antioxidantes (Plazonić, et al., 2009).

El perejil presenta diferentes e importantes componentes químicos, tales como flavonoides, fitol, ácido petroselínico, aceites esenciales ricos en apiol, miristicina y cumarinas, entre otros; estos compuestos le proporcionan al perejil propiedades diuréticas, antioxidantes, anticancerígenas y antienviejecimiento, así como la capacidad para la disminución de riesgo en enfermedades cardiovasculares. Además, el perejil contiene vitaminas A, C y E, minerales como fósforo, hierro, calcio y azufre (Kreydiyyeh y Usta, 2002).

La apigenina es una flavona mayoritaria en el perejil que ha demostrado estar asociada con la baja prevalencia de hipertensión, enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes y cáncer. Se ha comprobado que induce apoptosis en células cancerígenas de próstata, mama, leucemia y reduce el riesgo de cáncer de ovarios, además de ser un potente antiinflamatorio (Arango et al., 2013).

Algunos países donde se han investigado especies de perejil son: Serbia, Japón, Iraq, Turquía, Alemania, USA, China y Croacia. Actualmente el perejil es utilizado ampliamente como condimento en diversos tipos de alimentos y como ingredientes activos en la farmacología en México (Munguía et al., 2012). Aun cuando se encuentra bien posicionado y aceptado por la población, utilizado en diferentes platillos y en la medicina tradicional, existe poca investigación científica de las especies de perejil consumido en México así como de los diferentes flavonoides, las características de estos compuestos bioactivos, este conocimiento es indispensable para demostrar las actividades biológicas propuestas y beneficios a la salud que puedan tener. Por lo que es importante obtener esta información en perejil *Petroselinum crispum* y *Petroselinum sativum* utilizado en México.

## 2.2 Justificación

Las reacciones de los radicales libres han sido objeto de investigación, debido a que sus mecanismos de reacción pueden ser importantes diversas enfermedades (Mercado-Mercado, de La Rosa Carillo y Wall-Medrano, 2013). En una investigación *in vitro* de los efectos antioxidantes del perejil, se encontró un papel importante de sus compuestos fenólicos en el desarrollo de algunas enfermedades y su interacción en la inhibición o disminución de radicales libres (Fejes et al., 1998).

En Iran el perejil *Petroselinum crispum* es utilizado en la medicina tradicional para tratar la hiperuricemia y gota (Haidari, Keshavarz, Shahi, Mahboob y Rashidi, 2011). En Marruecos la misma especie es una de las hierbas medicinales utilizadas para tratar enfermedades cardiovasculares como la hipertensión (Gadi et al., 2009).

En diferentes países se han realizado estudios en diferentes especies de perejil, para la cuantificación de flavonoides y su potencial antioxidante, análisis de sus glucósidos y/o agliconas, como: *Caucalis platycarpus* L. en Zagreb, Croacia (Plazonić et al., 2009; Oršolić, Bevanda, Kujundžić, Plazonić, Stajcar y Kujundžić, 2010); *Petroselinum fructus* en Serbia (Mišan, 2009) *Coriandrum sativum* en Tokyo, Japón (Huijuan, Huifeng, Chuanzong, Hisanori y Hideaki, 2012); *Petroselinum sativum* en Baghdad, Iraq (Layla, Kahtan y Shalal, 2012) y en Estambul, Turquía (Leyla, Kevser, Esma y Reşat, 2008); *Petroselinum crispum* en Stuttgart, Alemania (Kaiser, Carle y Kammerer, 2013; Gebhardt et al., 2005) en Beltsville, Maryland, USA (Luthria, 2008) y en la Province Jiangsu, de la República Popular de China (Zhang, Chen, Wang y Yao, 2006). Sin embargo, no existe información en nuestro país de los compuestos bioactivos presentes en *P. sativum* y *P. crispum* (especies consumidas en México).

El perejil es utilizado ampliamente como condimento, sus hojas rizadas son utilizadas como aderezo y como saborizante de carnes, salchichas, alimentos enlatados, sopas, salsas y como sazonzador, también es apreciado como aromatizante de quesos. Además, se le utiliza como elemento decorativo en diferentes platillos (Grüner, Reinhold y Gil, 2008).

El metabolismo que sufren los flavonoides en el organismo, los beneficios que aportan en diferentes enfermedades y el hecho que en nuestro país el perejil a pesar de que este vegetal es bien aceptado y consumido, es escasa la información sobre su composición química y capacidad antioxidante, resulta importante la cuantificación y caracterización de estos flavonoides en el perejil producido y consumido en México. Por ello, se evaluará el contenido de flavonoides en el perejil (*P. sativum* y *P. crispum*) al someterlo a diferentes tratamientos térmicos por calentamiento en agua a 100 °C, calentamiento con vapor y en estado de senescencia.

### **3 HIPÓTESIS**

Los tratamientos térmicos como inmersión (agua destilada a 100 °C) y cocción a vapor modifican el contenido de compuestos fenólicos en las especies de perejil *Petroselinum crispum* y *Petroselinum sativum*.

### **4 OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo General**

Caracterizar y cuantificar el contenido de flavonoides en dos especies de perejil (*Petroselinum sativum* y *Petroselinum crispum*) cultivado en México y evaluar el efecto causado por tratamientos térmicos.

#### **4.2 Objetivos específicos**

- Evaluar el contenido de polifenoles y flavonoides totales en dos especies de perejil (*Petroselinum crispum* y *Petroselinum sativum*)
- Evaluar el contenido de flavonoides en el perejil al someterlo a diferentes tratamientos térmicos por inmersión en agua a 100°C y cocción a vapor a diferentes tiempos (1, 5, 15 y 30 minutos).
- Analizar las modificaciones en el contenido de polifenoles y flavonoides totales en senescencia.
- Identificar y cuantificar los flavonoides bioactivos en las dos especies de perejil.

## 5 ANTECEDENTES

### 5.1 El perejil

Botánicamente, el perejil es una planta herbácea bienal, perenne de corta duración, muy ramificada, de color verde, tallo cilíndrico erecto, de 30-80 cm de altura, hojas rizadas y espesas, con raíces primarias largas, cónicas, blancas u ocre. En su primer año forma una roseta terrestre de hojas compuestas, divididas hasta tres veces, de color verde oscuro y brillante; durante su segundo año produce un tallo ramificado de hojas alternas y que termina en umbelas de flores verde amarillosas, las frutas del perejil son pequeñas diaquenas ovoides o esféricas, con dos laterales unidos (mericarpes), el mericarpo aislado se curva y se adelgaza (Moazedi et al., 2007; Fonnegra y Jiménez, 2007). En la Tabla 1 se presenta la clasificación botánica del perejil.

**Tabla 1. Clasificación botánica del perejil.**

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
Superdivision	<i>Spermatophyta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Apiales</i>
Familia	<i>Apiaceae (Umbelliferae)</i>
Subfamilia	<i>Apioideae Apioideae superclade</i>
Tribu	<i>Apium clade</i>
Género	<i>Petroselinum</i>

Fuente: USDA y NRCS, 2013.

Los factores ambientales tienen un importante efecto en el contenido de polifenoles. Estos factores pueden ser el tipo de suelo, exposición al sol, tipo agricultura y cultivo (invernadero, en campo, orgánico, hidropónico) el grado de



senescencia afecta considerablemente las concentraciones y proporciones de los diversos polifenoles (Priecina y Karlina, 2013).

El perejil se cultiva ampliamente como hortaliza (Fonnegra y Jiménez, 2007). Es una planta que crece mejor a la sombra, pero es capaz de crecer en la mayoría de las condiciones climáticas, requiere de climas cálidos, aunque resiste bien el frío, crece mejor en suelos húmidos, profundos, sueltos, frescos, provistos de materia orgánica muy descompuesta, limpio de malas hierbas y con una alta disponibilidad de agua en el suelo, lo que se consigue con un adecuado manejo del riego y un buen cultivo (Cun, León y García, 2007).

Esta planta necesita gran cantidad de fertilizantes nitrogenados para una producción importante (Cun et al., 2007). El suelo debe de ser neutro ya que no tolera un pH inferior a 6,5 ni superior a 8. La buena textura del suelo se consigue con una labor profunda antes de la siembra y seguido de varias labores superficiales que lo mantengan suelto (Infoagro Systems, 1997).

*Petroselinum* proviene del nombre común griego *petros*, que significa *roca* y fue dado a una especie de perejil que crecía sobre las rocas, el perejil es originario de la Isla de Cerdeña desde donde se extiende a todos los países del Mediterráneo. El *crispum* se refiere a la forma crespada de sus hojas (Moazedi et al., 2007). El perejil *Petroselinum crispum* pertenece a la familia Apiaceae, ampliamente cultivada como hierba, especia y vegetal (Rezazad y Farokhi, 2014; Mahmood, Hussain y Malik, 2014). *Petroselinum hortense* o según una clasificación más reciente *Petroselinum sativum*, pertenece a la familia Umbrelliferae y es originario del área del Mediterráneo y de Asia occidental, es una planta cultivada en casi todos los huertos y muy estimada por sus propiedades aromáticas y medicinales (Stein Maizo, 2014).

Se pueden encontrar diferentes especies de perejil. El perejil de hoja lisa (*Petroselinum sativum latifolium* Hoffm), el perejil de Nápoles de la misma

especie que el de hoja lisa, pero la hoja tiene mayor tamaño, el perejil de hoja crespa o rizada (*Petroselinum crispum* Mill), el perejil tubroso o perejil de Hamburgo (*Petroselinum sativum crispum tuberosum* Bernh), perejil rizado especie “Forest Green” (*Petroselinum hortense*) y perejil Italiano (*Petroselinum crispum* var. *neapolitanum* Danert (Simon, Chadwick y Craker, 1984; Simon, Rabin y Clavio, 2013; Hochmuth et al., 1999; Burton, 2002).

La especie *Cryptotaenia japonica* Hassk. también conocido como perejil Japonés o Mitsuba también pertenece a la familia botánica *Apiaceae*, al orden *Apiales*, pero el género es distinto al perejil común (USDA y NRCS, 2013).

Las especies de perejil, que se conocen en México, son básicamente dos: de hoja lisa o común (*Petroselinum sativum* Hoffm. ssp. *Microcarpum*) que presenta un sabor y aroma fuertes, empleándose habitualmente en la cocina mediterránea; y perejil de hoja rizada o perejil chino (*Petroselinum crispum* (Mill). Nyman ex A.W. Hill) de sabor suave y dulce.

### **5.1.1 Efectos benéficos del perejil**

En medicina tradicional la raíz del perejil es usada como diurético en las infecciones del tracto urinario, para la hidropesía y para la gota. También existen reportes de que es empleada para la ictericia, problemas de los ojos, esguinces, cortaduras, picaduras y quemaduras (Munguia et al., 2012).

Kreydiyyeh y Usta (2002) demostraron que los efectos positivos a la salud se debían a diferentes compuestos específicos, el extracto acuoso de semillas de perejil (*Petroselinum crispum*) actúa como diurético, disminuyendo la retención de sodio y la excreción de potasio. En experimentación con ratas se demostró la eficiencia del extracto etanólico de hojas y tallos de perejil (*Petroselinum crispum*), para la prevención de úlcera gástrica y protección de la mucosa gástrica contra lesiones inducidas por agentes necrotizantes (Al-Howiriny et al.,

2005; Al-Howiriny, Al-Sohaibani, El-Tahir y Rafatullah, 2003). También se encontró acción benéfica del extracto hidroalcohólico del perejil (*Petroselinum sativum*) probada en ratas, frente a la acción tóxica ejercida por sulfato ferroso y vitamina C (Guija et al., 2011).

Troncoso y Guija (2007) demostraron el efecto hepatoprotector de hojas de perejil (*Petroselinum sativum*) al administrarlo en ratas con intoxicación hepática inducida por paracetamol, dicho efecto resultó aun mayor al compararlo con el fármaco hepatoprotector Purinor®, concluyendo que el efecto hepatoprotector se debe a las propiedades antioxidantes del perejil, las cuales están relacionadas con su contenido en flavonoides, que forman parte del grupo de los polifenoles. Esto abre la posibilidad de investigar acerca del efecto que podría tener el consumo de perejil o de los productos a base de este.

### **5.1.2 Compuestos químicos en el perejil**

Los valores nutricionales del perejil fresco por 100g son los siguientes: carbohidratos 6.3g, azúcar 0.9g, fibra dietética 3.3g, grasa 0.8g, proteína 3.0g, vitaminas 2.2mg, calcio 138.0mg, hierro 6.2mg, magnesio 50.0mg, fósforo 58.0mg, potasio 554mg y zinc 1.1mg (USDA y NRCS, 2013).

Los diversos componentes químicos del perejil confieren a esta planta un alto potencial para su uso farmacológico, en el perejil rizado (*Petroselinum crispum*) se encuentran diferentes clases de flavonoides; como flavonoles (kaempferol y quercetina), flavonas (apigenina y luteolina) y algunos glucósidos de estos flavonoles y flavonas (Peterson, Lampe, Bammler, Gross-Steinmeyer y Eaton, 2006).

Moazedi et al., (2007) reportaron que los componentes característicos del perejil (*Petroselinum crispum*) son flavonoides (apíina, luteolina, apigenina y algunos glucósidos), aceite esencial (apiol y miristicina), cumarinas (bergapteno, imperatorina, xantotoxina, trioxaleno y angelicina).

En *Petroselinum hortense* (ahora *sativum*) además de los componentes químicos ya descritos, contiene apreciables cantidades de vitaminas C y E, minerales como fósforo, hierro, calcio y azufre (Troncoso y Guija, 2007; Kreydiyyeh y Usta, 2002). Así mismo, Bursac, Popovic, Mitic, Kaurinovic y Jako, (2005) encontraron estos compuestos en *Petroselinum crispum*.

Mohammad (2010), reportó que el perejil liso (*Petroselinum hortense*) tiene una alta concentración de ácido petroselinico, furanocumarinas, oleorresinas, proteínas, carbohidratos y taninos. Otro compuesto presente en el perejil en cantidades moderadas es el ácido oxálico en forma de oxalatos (Ortega, Basabe y López, 2006).

El tamizaje fitoquímico de perejil (*Petroselinum crispum*) reveló la presencia de taninos, flavonoides, esteroides y triterpenos (Al-Howiriny et al., 2005). En otro estudio en la misma especie, se aislaron e identificaron las siguientes agliconas y glucósidos: la apigenina, apigenina-7-orto-glucósido o cosmosiina, apigenina-7-orto-apiosil-glucósido o apiina y la cumarina 2", 3"- dihidroxifuranocoumarina o hidrato oxipeucedanina (Chaves et al., 2011).

Plazonić y colaboradores (2009) cuantificaron en extracto metanólico de la especie de perejil *Caucalis platycarpos* L. originaria de Zagreb (Croacia), cuatro ácidos fenólicos (3-orto-cafeoilquínico, cafeico, p-cumárico, o-cumárico), cuatro glucósidos flavonoides (luteolina-7-orto-glucósido, apigenina-7-orto-glucósido, quercetina-3-orto-galactósido, quercetina-3-orto-ramnósido) y tres agliconas de flavonoides (luteolina, apigenina, crisoeriol).

Son numerosos los artículos científicos donde reportan los compuestos bioactivos en el perejil y sus aportes benéficos a la salud. En la Tabla 2 y 3 se presentan los principales.

**Tabla 2. Componentes bioactivos e importancia medicinal (probadas y/o presuntiva) aislada de *Petroselinum crispum*.**

Constituyente químico	Importancia medica	Referencias
Componentes fenólicos	Actividad antioxidante y antibacterial.	Wong y Kitts, 2006
Apiol y miristicina	Efecto diurético	Tyler, 1994; Newall, Anderson y Phillipson, 1996.
Aceites esenciales	Efecto diurético	Darias, Martin-Herrera y Abdala, 2001
Ácido ascórbico	Evitar riesgo de cálculos renales	Massey, Liebman y Kynast-Gales, 2005
Terpenoides, flavonoides, glucosidos, coumarinas, ácido ascórbico	Propiedades anti-diabetes	Anand, Sharma y Gupta, 1981; Davey, Bauw y Montagu, 1996
Flavonoides (apiina, luteolina, otros glicósidos de apigenina), ácido ascórbico, tocoferol y aceites esenciales (apiol y miristicina)	Propiedades antioxidanetes.	Nielsen, et al., 1999; Fejes et al., 2000; Marczał, Balogh y Verzar-Petri, 1997
Apigenina (flavona)	Efecto antiproliferativo y apoptosis selectiva en las leucemias monocíticas y linfocíticas	Vargo et al., 2006.
Aceite esencial de perejil	Reprime respuesta inmune celular y humoral, alergias, trastornos autoinmunes e inflamatorias crónicas	Alireza, Daneshmandi, Soleimani, Bagheri y Mohammad, 2012
Kaempferol y quercetina	Tratamiento en hiperuricemia	Fatemeh, Seid, Majid, Soltan-Ali y Mohammad-Reza, 2011
$\alpha$ tocofenol y flavonoides	Interviene en activación y agregación de plaquetas, enfermedades cardiovasculares	Mobile, Bruckdorfer y Rice-Evans, 1999; Janssen et al., 1998; Pearson et al., 2002; Rein et al., 2000; Pace-Asciak, Hahn, Diamandis, Soleas y Goldberg, 1995

**Tabla 3. Componentes bioactivos e importancia medicinal (probadas y/o presuntiva) aislada de *Petroselinum sativum*.**

<b>Constituyente químico</b>	<b>Importancia medica</b>	<b>Referencias</b>
Componentes fenólicos	Actividad antioxidante y antibacterial.	Wong y Kitts, 2006
Vitaminas y minerales	Procesos de crecimiento y producción de energía	Troncoso y Guija, 2007; Kreydiyyeh y Usta, 2002
Antioxidantes del perejil	Efecto hepatoprotector	Troncoso y Guija, 2007
Flavonoides, ácido petroselínico, aceites esenciales y cumarinas	Efecto diurético, modulación de respuesta inmune celular	Kreydiyyeh y Usta, 2002
Apigenina	Efecto citotóxico en adenocarcinoma mamario, reduciendo el volumen de tumores	Layla, Kahtan y Shalal, 2012
Apiol, ácido eicosanoico, ácido hexadecanoico, fitol y ácido octadecanoico	Antiinflamatorio , artritis, diurético, sistema inmunitario y cardiovascular	Ortega, Basabe y López, 2006
Miricetina	Agente quimiopreventivo potencial	Zheng, Kenney y Lam, 1992

## **5.2 Polifenoles**

En base al número de subunidades del fenol, se clasifica en dos grupos básicos, los fenoles y los polifenoles. Los fenoles simples contienen también los ácidos fenólicos, mientras que los polifenoles contienen al menos dos anillos fenólicos (Marinova, Ribarova y Atanassova, 2005).

Los polifenoles son agentes reductores que protegen a los tejidos contra el estrés oxidativo, comúnmente se les conoce como antioxidantes ya que pueden evitar reacciones de oxidacion en los alimentos y a nivel celular por lo que

pueden prevenir enfermedades, como cancer, enfermedades cardiovasculares e inflamatorias (Scalbert y Williamson, 2000).

La biosíntesis de los polifenoles en las plantas tiene lugar a través de dos rutas, la ruta del ácido shikímico y la ruta de los poliacetatos. En la ruta del ácido shikímico se producen la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina) y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). La ruta de los poliacetatos da lugar de las quinonas y las xantonas (Quiñones, Miguel y Aleixandre, 2012).

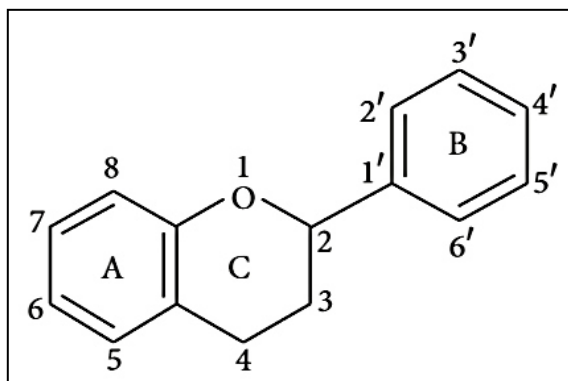
### **5.3 Flavonoides**

Los flavonoides son un grupo dentro de los polifenoles, los cuales son pigmentos naturales que también se encuentran en frutas, verduras, semillas, flores, en diversas bebidas como el vino, té verde y té negro. Protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos UV, la contaminación ambiental y sustancias químicas presentes en los alimentos. Los flavonoides son consumidos en la dieta de forma habitual y son necesarios debido a que el organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación y en forma de suplementos nutricionales (Martínez-Flórez et al., 2002).

Los flavonoides, junto con los ácidos fenólicos, son un grupo extenso de compuestos caracterizados por una estructura benzo-γ-pirano (Cartaya y Reynaldo, 2001). Son sintetizados por vía fenilpropanoide presente en las plantas, las actividades biológicas en ellas están condicionadas por su estructura, grado de hidroxilación, otros substitutos y conjugaciones y grupos de polimerización (Kumar y Pandey, 2013)

Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común difenilpirano (C6-C3-C6'), este esqueleto está compuesto por dos anillos fenilo

(A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico (Figura 1). Los átomos de los anillos A, B y C se numeran utilizando números ordinarios para los anillos A y C y números primos para el anillo B. El anillo A se biosintetiza a través de la ruta de los poliacetatos y el anillo B junto con la unidad C3 proceden de la ruta del ácido siquímico (Quiñones et al., 2012).



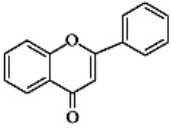
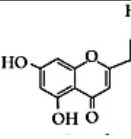
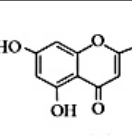
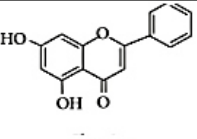
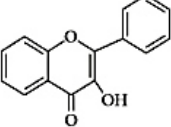
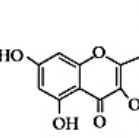
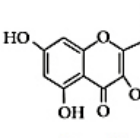
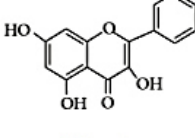
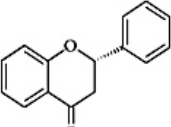
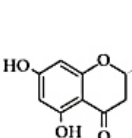
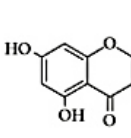
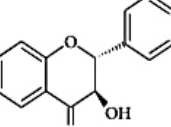
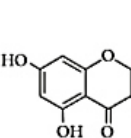
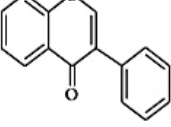
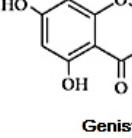
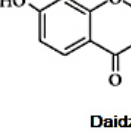
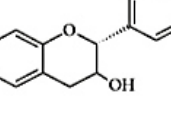
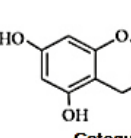
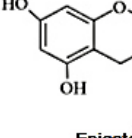
**Figura 1 Estructura general de los flavonoides.** Fuente: Kumar y Pandey, 2013.

Los flavonoides constituyen una amplia familia de compuestos que a su vez incluye varios grupos entre los que destacan: flavonas, flavonoles, chalconas, flavanonas, antocianidinas, isoflavonas, flavanoles, citroflavonoides, proantocianidinas, ácido elágico y kaemferol, de acuerdo a sus estructura molecular y química de los anillos A y B y la oxidación del anillo C (Quiñones et al., 2012; Rivas-Gonzalo y García-Alonso, 2002). En la Figura 2 se presentan las estructuras químicas de los grupos flavonoides así como ejemplos de cada grupo.

Los flavonoides se encuentran como agliconas, glicósidos y derivados metilados. La posición del sustituto bencenoide divide las clases de flavonoides (posición 2) isoflavonoides (posición 3). Los flavonoides son a menudo hidroxilados en las posiciones 3,5,7,2,3',4',5'. Cuando se forman glucosidos, el enlace glicosídico se encuentra en las posiciones 3 y 7 y el carbohidrato puede ser L-ramnosa, D-glucosa, galactosa o arabinosa (Kumar y Pandey, 2013).



Mientras los flavanonas y flavanoles tienen un enlace simple entre los átomos 2 y 3 del anillo C, los flavonas, flavonoles, isoflavonas y antocianidinas tienen un doble enlace o aromático allí. El anillo B está normalmente unido a la posición 2 del anillo C excepto en el caso de los isoflavonoides (Kinoshita, Lepp, Kawai, Terao y Chuman, 2006).

Grupos flavonoides	Esqueleto estructural	Ejemplos		
Flavonas		 Luteolina	 Apigenina	 Crisina
Flavonoles		 Quercetina	 Kaempferol	 Galangina
Flavanonas		 Hesperetina	 Naringenina	
Flavanonoles		 Taxifolina		
Isoflavonas		 Genisteina	 Daidzeina	
Flavan-3-oles		 Catequina	 Epicatequina	

**Figura 2. Estructura de los flavonoides.** Fuente: Kumar y Pandey, 2013.

Las flavonas no suelen encontrarse en frutas, pero sí en cereales y en muchas plantas herbáceas como el perejil, hierbas aromáticas como el romero y

el tomillo. Los glicósidos de flavonas están presentes en verduras y hortalizas. Al igual que las flavonas no glicosídicas y altamente metoxiladas son responsables del sabor amargo de algunos cítricos. Las flavanonas o dihidroflavonas forman un grupo minoritario en los alimentos, aunque se pueden encontrar en frutas cítricas. Las isoflavonas son compuestos que se encuentran principalmente en legumbres. La soya es una fuente reconocida de daidzeína y genisteína, aunque también se encuentran en frijol y chícharo (Rivas-Gonzalo y García-Alonso, 2002).

Los flavonoles se encuentran repartidos abundantemente en todos los alimentos de origen vegetal y cáscaras de las frutas, las cuales son particularmente ricas en estos compuestos, presentándose generalmente en forma de glicósidos (Aheme y O'Brien, 2002).

Los flavanoles se pueden encontrar en cereales, frutas y sus derivados, té y cacao. Las verduras y hortalizas son pobres en estos compuestos, con la excepción de las habas y lentejas (de Pascual-Teresa, Rivas-Gonzalo y Santos-Buelga, 2000).

### **5.3.1 Funciones de los flavonoides en las plantas**

Hay muchas especies de plantas que contienen sustancias de valor medicinal, en muchos lugares del mundo la medicina tradicional sigue haciendo contribuciones a la medicina actual con excelentes resultados. Es frecuente el uso de plantas o de sus compuestos bioactivos como terapia para ciertas enfermedades, lo cual ha impulsado la investigación fitoquímica (Reyes Ruíz, Venegas Casanova, Chávez Gaona y Eustaquio Saldarriaga, 2010).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas, actualmente se conoce mas de 8,000 estructuras fenólicas que van desde moléculas simples como ácidos fenólicos hasta sustancias altamente polimerizadas como taninos (Priecina y Karlina, 2013).

Los flavonoides actúan en las plantas como antioxidantes, antimicrobianos, fotorreceptores, atractores visuales, repelente de insectos, detección de luz y protección contra la radiación UV (Stan, Soran, Varodi y Lung, 2012).

Los flavonoides es el grupo más ampliamente distribuido en las plantas, particularmente en células fotosintéticas. Son los que dan la mayoría de colores en las flores. Los flavonoles son los flavonoides más abundantes en los alimentos, les brindan color, sabor, prevención de oxidación lipídica, protección a vitaminas y enzimas de los procesos de oxidación. Los flavonoides encontrados en mayor contenido en la dieta son los isoflavonas, flavonoles y flavonas (Yao et al., 2004).

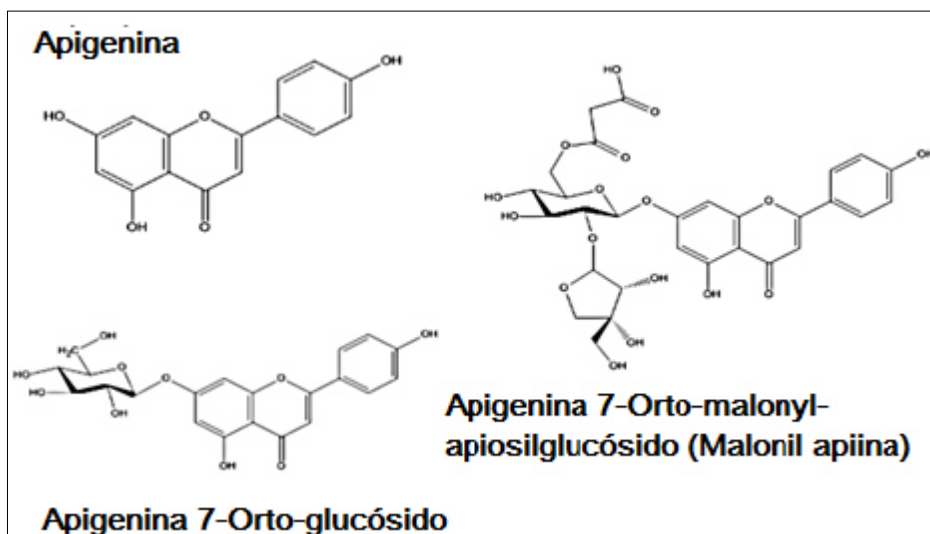
Varios factores abióticos y bióticos ayudan en la generación de especies reactivas de oxígeno en plantas siendo importante para el estrés oxidativo. La biosíntesis de los flavonoides es mayor casi exclusivamente por medio del estrés oxidativo. La medida de la capacidad y habilidad antioxidante para absorber la longitud de onda UV depende de la naturaleza de sustitución en los diferentes anillos de los flavonoides (Kumar y Pandey, 2013).

### **5.3.2 Apigenina**

En el perejil, la flavona mayoritaria es el glucósido apigenina (510-630 mg/100g) (Justesen y Knuthsen, 2001). La apigenina, como muchos flavonoides en las plantas está conjugado con azúcares, ácidos simples (acetil y malonil) y ácidos cinámicos (Figura 3).

Los glucosidos de apigenina son abundantes en el perejil, el orto-glucosido ha sido evaluado por hidrólisis y comparado con estándar de agliconas, pero el orto-glucosido intacto de apigenina no puede ser directamente identificado por este método. En el perejil fresco el apigenoide principal es la apigenina orto-malonilapiosilglucosido (malonilapiina), en menor cantidad la apigenina orto-

apiosilglucosido (apiina). En jugos de perejil el predominante es la apiina (Hostetler, Riedl y Schwartz, 2009).



**Figura 3. Estructura de apigenina en forma de aglicona (apiina) y dos glucosidos.** Fuente: Hostetler, Riedl y Schwartz, 2009.

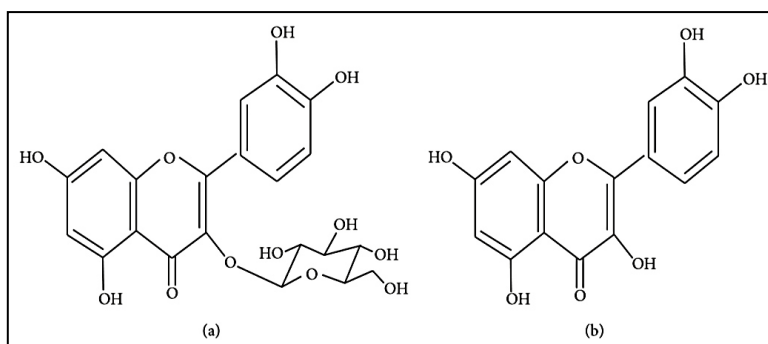
La apigenina junto con la luteolina también reduce la adhesión de monocitos a LDL, que muestra potencial para prevenir una de las etapas iniciales de la aterosclerosis (Jeong et al., 2007). Además, las flavonas en estudios con animales demostraron la capacidad de atenuar la respuesta inflamatoria (Nicholas et al., 2007; Ueda yamazaki y Yamazaki, 2004).

Se han realizado numerosos estudios en células animales entre ellos destaca el de Piantelli et al., (2006) quienes concluyeron que la administración de 50 mg/kg de apigenina a 24 horas antes de la inyección de células tumorales, reduce significativamente el depósito de tumor pulmonar. Engelmann et al., (2002) reportó que concentraciones mayores a 30 g/mL suministrados a ratones con tumor en colon y pulmón representan una significativa acción citostática y antiangiogénica de crecimiento tumoral *in vitro*. Walle, Ta, Kawamori, Wen, Tsuji y Walle (2007) concluyeron que la apigenina promueve la detención o paro del ciclo celular en cáncer de lengua en ratas entre la fase G2 y M.

Mak et al., (2006) determinaron en células humanas que el mecanismo de acción benéfica de la apigenina como mediador en la supresión del crecimiento de células de cáncer en próstata y mama es por medio de receptores de estrógenos. Por otro lado Manthey y Guthrie (2002) utilizó estándar de apigenina en concentraciones de 50% y 90% como inhibidor en células de cáncer de mama, próstata, colon, pulmón y melanoma, probando una actividad antiproliferativa mayor en melanoma.

### 5.3.3 Absorción intestinal de flavonoides

La absorción de los flavonoides de la dieta, liberados por los alimentos al ser masticados depende de sus propiedades fisicoquímicas como el tamaño molecular, configuración, liposolubilidad y sus pKa. Los flavonoides pueden ser absorbidos por el intestino delgado o tienen que ir al colon antes de su absorción. Esto depende de si se encuentran como agliconas o glicósidos (Figura 4). Las agliconas pueden ser absorbidas fácilmente por el intestino delgado, mientras que los glicósidos deben ser convertidos en forma de agliconas para su absorción (Kumar y Pandey, 2013).



**Figura 4. Estructura de flavonoides (a) glicosido flavonoide y (b) aglicona flavonoide.** Fuente: Kumar y Pandey, 2013.

En la naturaleza, la mayoría de los flavonoides en los alimentos se encuentran como glucósidos, pero también existen como agliconas y ésteres, los cuales no se pueden absorber en el intestino de la misma manera (Quiñones et

al., 2012). La hidrólisis intestinal de glicósidos flavonoides, varía de acuerdo con los azúcares y otros grupos funcionales unidos al núcleo flavona.

Los glucósidos de flavona pueden ser hidrolizados a sus agliconas respectivas en el intestino delgado por  $\beta$ -glucosidasa. En contraste, los glicósidos flavonoides con residuos de disacáridos y grupos malonil son resistentes a la  $\beta$ -glucosidasa intestinal respecto a sus contrapartes con glucósidos simples, limitando potencialmente su biodisponibilidad (Németh et al., 2003). Luego de ser absorbidos las flavonas son glucuronizadas y sulfatadas por el intestino delgado y el hígado antes de alcanzar la circulación sistémica (Boersma et al., 2002).

Los polifenoles que no se pueden absorber en el intestino delgado, llegan al colon donde la microflora hidroliza los glucósidos en agliconas y éstas son metabolizadas en distintos ácidos aromáticos (Setchell, Brown y Lydeking-Olsen, 2002).

Tian et al., (2009) descubrió que las agliconas apigenina y luteolina se absorben más fácilmente en las células intestinales en forma de glucosidos como: apigenina 6-C-glucósido o luteolina 7-orto-glucósido.

Nielsen et al., (1999) observó que la conversión de apiina a su glucósido flavonoide simple, apigenina 7-orto-glucósido (apigenina), puede mejorar la absorción. Este mismo autor y colaboradores en 1999 hicieron una investigación *in vivo* con 14 voluntarios que consumieron una dieta que contenía 20 g de perejil *Petroselinum crispum*, durante el estudio determinaron que la vida media de la apigenina en el cuerpo humano es de 12 horas.

Otros datos apoyan que apiosil glucósido de flavona, otro tipo de compuesto encontrado en el perejil, es absorbido en el colon, mientras que los glucósidos simples, tales como la apigenina 7-orto-glucósido se absorben en el intestino

delgado (Meyer, Bolarinwa, Wolfram y Linseisen, 2006; Cao, Zhang, Chen y Zhao, 2010).

Los metabolitos de flavonoides tienen diferentes propiedades biológicas y antioxidantes después de ser metabolizados por el cuerpo (Lotito, Wei-Jian yang, Crozier y Frei, 2011) por ejemplo, los glucósidos y agliconas de la apigenina evitan la agregación plaquetaria hemostásica, lo cual ayudaría a pacientes con alto riesgo de trombosis, con aterosclerosis, mal funcionamiento en la circulación sanguínea (Chaves et al., 2011). Al igual que la luteolina-7-orto-glucósido de la alcachofa, entre otros metabolitos, se utilizan en el tratamiento de trastornos dispepticos y hepáticos (Wittermer et al., 2005).

#### **5.3.4 Efecto del tratamiento térmico sobre los flavonoides**

La preparación y procesamiento de los alimentos pueden disminuir los niveles de flavonoides, dependiendo del método utilizado (Kumar y Pandey, 2013).

El pensamiento tradicional es que las frutas y las verduras frescas o crudas tienen mayor valor nutricional que las cocidas o con algún tratamiento térmico. Sin embargo, contrario a esta premisa, la mayoría de los vegetales siguen siendo cocidos antes de su consumo. El proceso de tratamiento puede cambiar las características físicas y compuestos químicos de los vegetales, por lo que se debe evaluar a los métodos de procesamiento a fin de preservar las propiedades antioxidantes deseables de los alimentos (Kamel, 2013).

La extracción de compuestos fenólicos proveniente de las plantas es influenciada por varios parámetros como la polaridad de la sustancia de extracción, tamaño de partícula, procedimiento y condiciones de extracción. La mayoría de los flavonoides se producen naturalmente como glucósidos. Los compuestos fenólicos solubles se extraen generalmente utilizando agua, metanol, etanol o acetona. La presencia de azúcares unidos a la estructura flavonoide tiende a que los compuestos fenólicos sean más solubles en agua, la

combinación de las sustancias antes mencionadas son mejores solventes para los glucósidos (Stan et al., 2012). Esto hace suponer que los glucósidos pueden permanecer en el líquido de cocción en mayor nivel que sus agliconas correspondientes.

El efecto de la temperatura sobre la eficiencia de extracción ha sido estudiado anteriormente ya que impacta la solubilidad, el coeficiente de difusión y la estabilidad de los compuestos fenólicos (Gertenbach, 2001; Spigno, Tramelli y De Faveri, 2007).

Luthria (2008) observó que la cantidad de compuestos fenólicos extraídos de perejil (*Petroselinum crispum*) cambió significativamente al aumentar la temperatura de 40 °C a 160 °C, el contenido de fenoles totales es mayor a 70 °C pero para la extracción de apiina y malonilapiina es mejor a 100 °C. A temperaturas altas la cantidad de apiina y acetil-apiina aumenta, mientras que malonil-apiina disminuye, indicando que la malonilapiina es inestable a altas temperaturas y se convierte a acetil-apiina y a apiina por medio de descarboxilación y desacetilación.

En otro estudio las hojas de Daun Dewa (*Gynura divaricata*) fueron sometidas a temperaturas de 40 °C a 100 °C. Se encontró que el contenido total de compuestos fenólicos y contenido total de flavonoides se vió aumentado a partir de 90 °C, además aseguran que a esta misma temperatura hay mayor capacidad antioxidante y captación de radicales libres (Wan yu, Zhou, Liu, Tian y Cao, 2011).

Las enzimas endógenas que afectan el color, textura y propiedades del perejil (*Petroselinum crispum*) son las peroxidasas, polifenol oxidasas, clorofilasas y proteinasas. Estas enzimas se pueden inhibir parcialmente con el secado de la planta, pero recuperan su actividad al rehidratar el producto. La cresolasa cataliza la hidroxilación de monofenoles produciendo orto-derivados



(dihidroxilados) y la oxidación de orto-quinonas es catalizada por las actividades de la catecolasa, empezando el pardeamiento enzimático. También se ha demostrado que el tratamiento térmico de vapor-blanqueado y escaldado con agua a 90 °C y 100 °C producen la inactivación de polifenol oxidasas y el contenido de polifenoles es más alto en tiempos de calentamientos bajos (1-4 min) (Kaiser, Brinkmann, Carle y Kammerer, 2012).

Popovici, Capcanari, Deseatnicova y Sturza (2011) reportaron que la temperatura aumenta el contenido de polifenoles totales en *Petroselinum crispum* al calentar por inmersión por 60 y 80 °C, siendo su contenido mas alto en el último. El tiempo de tratamiento térmico también es muy importante ya que Kamel (2013) describe un aumento de compuestos fenólicos en la misma especie de perejil al calentar en microondas por 1 minuto a 750 W respecto a la muestra fresca sin tratamiento, también reporta un descenso subsecuente al calentamiento durante 2 y 3 minutos con las mismas condiciones y de igual forma una disminución de 12.73% al ser secado por microondas.

### **5.3.5 Cuantificación de flavonoides**

La determinación de flavonoides se puede lograr por HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución), este método tiene la capacidad de determinar y cuantificar agliconas, glucósidos y polifenoles simples por separado simultaneamente, como fue probado por Sakakibara, Honda, Nakagawa, Ashida y Kanazawa, (2003) en la determinación de estos compuestos en varios vegetales, frutas y tés, incluyendo el perejil.

Han sido utilizados diferentes columnas para la identificación y cuantificación de flavonoides por HPLC; C-18 250 x 4.6mm, 5 µm. (Kao, Huang, Inhbaraj y Chen, 2008; Zeraik y Yariwake, 2010; Justesen, Knuthsen y Leth, 1998) C-18 150 x 4.6 mm, 5 µm (Zhang, Zhou y Wang, 2010) y C-18 150 x 3.0 mm, 3.5 µm (Shu, Hong, Wu yu y Quin, 2010). Es muy importante el control de la

temperatura usando HPLC, la temperatura que se ha utilizado principalmente es de 40 °C (Zeraik y Yariwake, 2010; Shu et al., 2010).

Los solventes reportados para la cuantificación han sido principalmente acetonitrilo y agua con ácido fórmico al 0,1% (99.9: 0,1 v/v) a un pH 2.6, los cuales han sido utilizados modificando las concentraciones para diferentes plantas como lo describen Luthria, Mukhopadhyay y Kwansa (2006) y Justesen et al. (1998) para *Petroselinum crispum*, Kao et al. (2008) para *Gynostemma pentaphyllum*, Zeraik y Yariwake (2010) para *Passiflora edulis Sims f. flavicarpa*, Zhang et al. (2010) para *Bupleurum scorzonerifolium* Shu et al. (2010) para *Iris tectorum* Maxim.

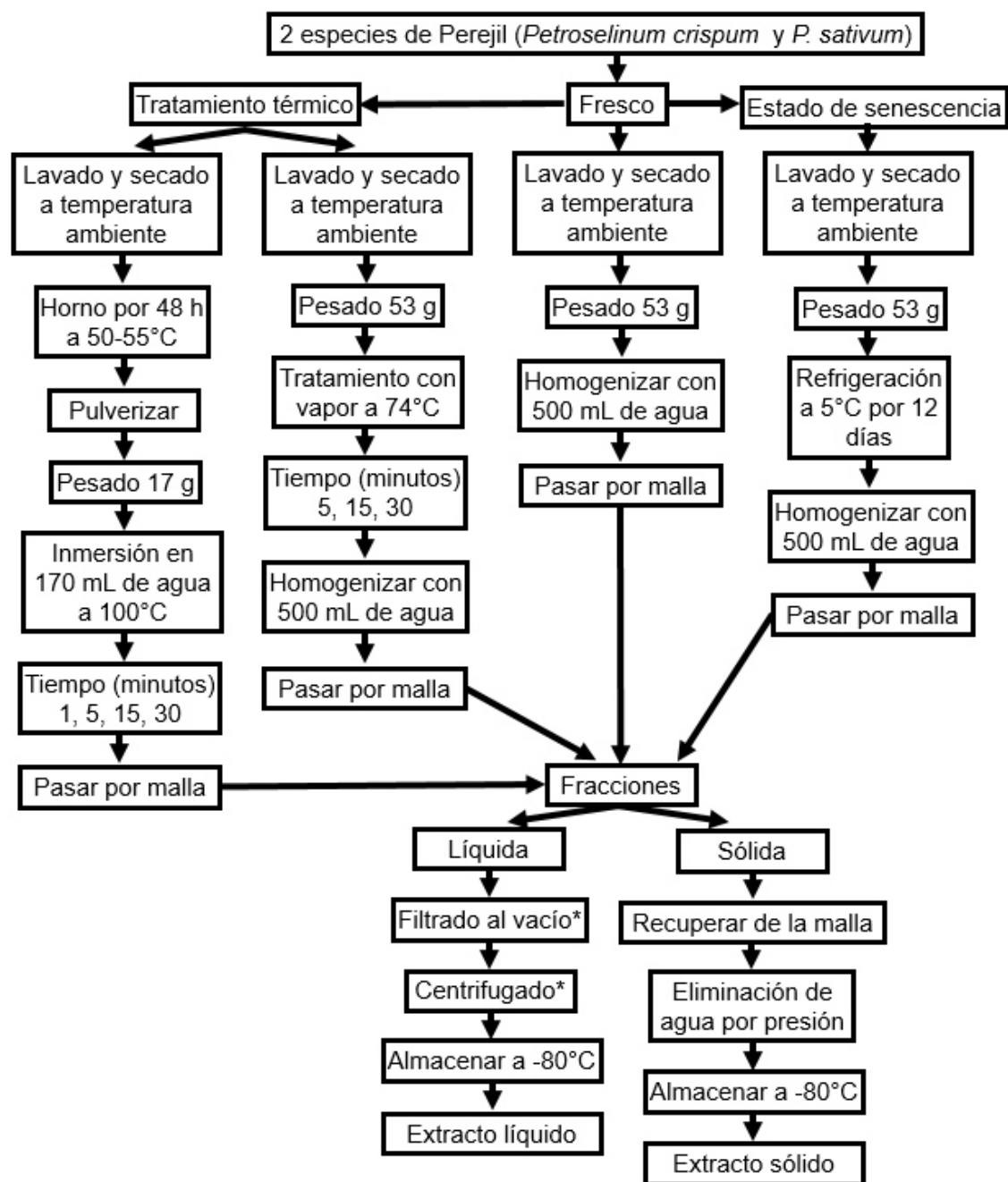
Las flavonas y flavonoles presentan dos rangos mayores de absorción: 320-385nm representa el anillo B, mientras que 250-285nm corresponde al anillo A. Los grupos funcionales pegados al esqueleto flavonoide pueden causar un cambio en la absorción como en el caso de kaempferol (3,5,7,4'-grupo hidroxilo) a 367nm, quercetina (3,5,7,3',4'-grupo hidroxilo) a 371nm y miricetina (3,5,7,3',4',5'-grupo hidroxilo) a 374nm. Los flavanones tienen un anillo heterocíclico saturado sin conjugación entre los anillos A y B, según sus características UV espectral entre 270 y 295nm (Kumar y Pandey, 2013).

Considerando los antecedentes presentados es necesario investigar si las especies de perejil que se consumen en nuestro país contienen los compuestos que han sido reportados en otras especies de perejil, si los tratamientos térmicos podrían llegar a modificar el contenido de estos y si los tiempos de cocción influyen igualmente en su contenido.

## **6 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Metodología**

Se analizaron dos especies de perejil fresco y 12 días después (estado de senescencia). Los tratamientos térmicos a los que se sometieron fueron: a) inmersión (agua destilada a 100 °C) y se tomaron muestras a 1, 5, 15 y 30 minutos y b) cocción a vapor durante 5, 15 y 30 minutos. Como control se estudió el perejil sin ningún tratamiento (0 minutos). Las pruebas que se realizaron en las dos especies de perejil y en los extractos líquidos y sólidos fueron la determinación de polifenoles totales, flavonoides totales, pruebas coloridas para la identificación de grupos funcionales, identificación y cuantificación de flavonoides por Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). En la Figura 5 se presenta el esquema general de análisis para los tratamientos realizados y en la Tabla 4 se especifican las determinaciones que se realizaron en los extractos (líquido y sólido) de los diferentes tratamientos.



\*Este procedimiento se repitió hasta que no quedo sedimento.

Figura 5. Esquema general de análisis.

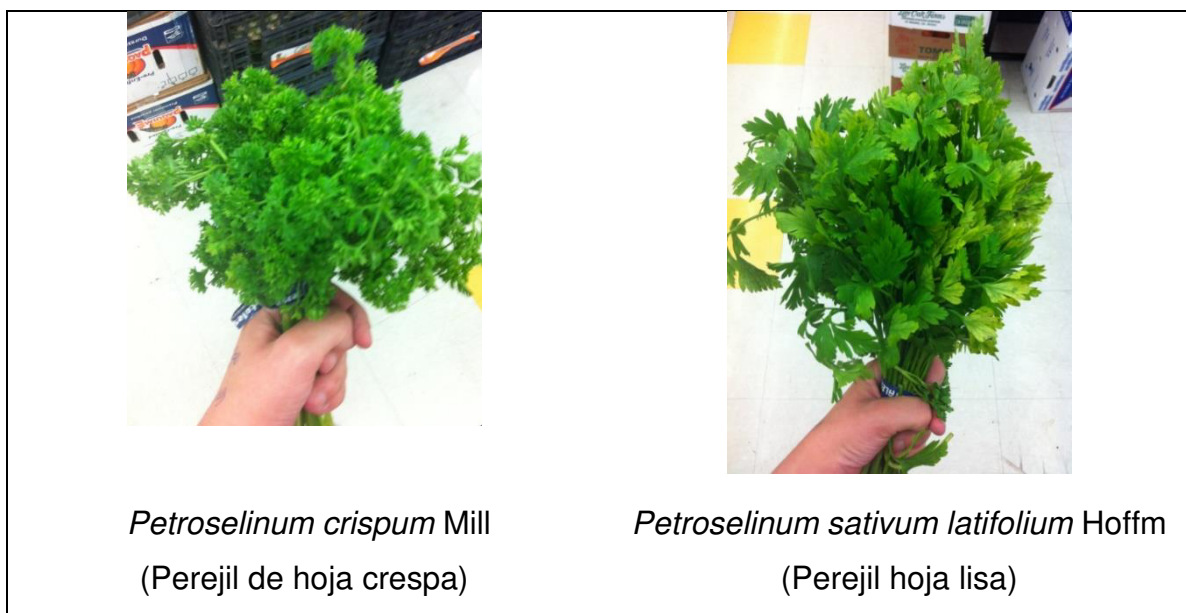
**Tabla 4. Análisis realizados a los extractos de los diferentes tratamientos.**

<b>Análisis</b>	<b>Extracto</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo (minutos)</b>
<b>Humedad</b>	NA	Control	0
		Vapor	5, 15 y 30
<b>Pruebas fitoquímicas</b>	Líquido	Control	0
		Inmersión	5
		Vapor	5
		Senescencia	NA
<b>Polifenoles y flavonoides totales</b>	Líquido	Control	0
		Inmersión	1, 5, 15, 30
		Vapor	5, 15, 30
		Senescencia	NA
	Sólido	Control	0
		Inmersión	1, 5, 15, 30
		Vapor	5, 15, 30
		Senescencia	NA
<b>Identificación y cuantificación de flavonoides</b>	Líquido*	Control	0
		Inmersión	1, 5, 15, 30
		Vapor	5, 15, 30
		Senescencia	NA

n=3, \*n=9, NA=No aplica

## 6.2 Material biológico

El material biológico de estudio fue la planta *Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman ex A.W. Hill y *Petroselinum sativum* Hoffm. ssp. Microcarpum, dos de las especies de perejil consumidas en nuestro país. En la Figura 6 se muestran fotografías de las especies estudiadas, las cuales se obtuvieron en un supermercado manteniendo los mismos criterios para las diferentes muestras.



**Figura 6. Especies de perejil consumidas en México.**

Posterior al momento de recepción del perejil se sometió inmediatamente a un procedimiento de extracción, los extractos fueron almacenados en congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso, tanto para el perejil fresco (control), los tratamientos térmicos y para el producto que ha iniciado la etapa de senescencia.

### **6.3 Métodos de obtención de los extractos**

#### **6.3.1 Tratamiento térmico por inmersión (agua destilada a $100^{\circ}\text{C}$ ) de las dos especies de perejil (*P. crispum* y *P. sativum*)**

Para la preparación de la muestra se tomó como base el método descrito por Cirilo Aguilar (2003) con algunas modificaciones que a continuación se describen. La extracción se realizó el mismo día que se adquirieron las muestras, las hojas y tallos fueron lavados con abundante agua, se procedió a secar a temperatura ambiente por 30 minutos, se colocó en la incubadora (Yamato, IC603C) por 48 horas a  $50\text{--}55^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente se pulverizaron las hojas secas y para estandarizar el tamaño de partícula de la muestra se pasó por una malla con tamaño de partícula 850 µm. Se pesaron 17 g de muestra en una balanza analítica (Sartorius, BL120S), por cada tiempo a analizar (1, 5, 15, 30 minutos) se calentaron 170 mL de agua destilada a 100 °C en parillas de calentamiento con agitador magnético (Thermo Scientific, SP131325), una vez transcurrido el tiempo se procedió a separar el extracto líquido y sólido.

### **6.3.2 Tratamiento térmico con vapor de las dos especies de perejil (*P. crispum* y *P. sativum*)**

Como preparación de la muestra se lavaron las hojas y tallos con abundante agua, se procedió a secar a temperatura ambiente por media hora.

Se pesaron 53 g de muestra fresca, se utilizó un baño de temperatura (VWR Internacional, 1265PC) para calentar el agua hasta 74 °C, las muestras se colocaron a vapor por 5, 15 y 30 minutos, transcurrido el tiempo de perejil se homogenizó (Osterizer Clásica) usando 500 mL de agua y se procedió a separar el extracto líquido y sólido.

### **6.3.3 Separación de los extractos.**

La obtención de los extractos fue igual para las dos especies de perejil estudiado. Las muestras se pasaron por una malla con tamaño de partícula 850 µm separando el extracto sólido y líquido, el extracto líquido se filtró con embudo y se centrifugó (Eppendorf, 5804R) a 2,500 rpm por 15 minutos a 4 °C, se filtró y centrifugó nuevamente a las mismas condiciones de 2,500 rpm por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se congeló a -80 °C en tubo Corning de 15 mL en obscuridad, para evitar la pérdida de los compuestos bioactivos fotosensibles, esta extracción se hizo por triplicado.

El extracto sólido se recuperó y colocó un papel filtro sobre la malla y presionó hasta que la muestra estuviera completamente seca, se colocó en tubos Corning con capacidad 50 mL y se congeló a -80 °C en obscuridad. Este mismo procedimiento se utilizó para las dos especies de perejil por triplicado en todos los tratamientos.

#### **6.3.4 Obtención de las dos especies de perejil (*P. crispum* y *P. sativum*) en estado de senescencia**

Para las muestras en estado de senescencia las muestras fueron lavadas, secadas y colocadas en una bolsa de plástico estéril para alcanzar un estado de senescencia (12 días en el refrigerador a 5 °C). La extracción de la porción líquida y sólida se realizó siguiendo el procedimiento antes mencionado en el apartado 6.2.3 por triplicado.

#### **6.4 Determinación de humedad**

Se determinó el contenido de humedad a las muestras de los diferentes tratamientos de perejil para expresar los resultados en base seca del producto.

Para la determinación se siguió el método de Official Methods of Analysis of AOAC International AOAC 14.003, se cuantificó mediante la diferencia entre el peso inicial y final, de una muestra representativa sometida a una temperatura de 130° C en un horno marca Felisa modelo FE-292D (AOAC, 1990).

Se llevó a peso constante el crisol porcelana en la estufa a 110 °C, por un periodo de 1 hora y periodos subsecuentes de 15 minutos. Se colocó en el desecador (Pyrex) 10 minutos y se pesó el crisol. En una balanza analítica (Sartorius, BL120S), se pesó 1 g de muestra. Se colocó el crisol con la muestra en la estufa durante 3 horas a 110 °C, al terminar se pasó al desecador durante 10 minutos y se pesó el crisol. La pérdida de peso representa la humedad de la muestra. La expresión empleada para el cálculo fue la siguiente:



**Pérdida de peso:** g muestra húmeda – g en muestra seca.

**% de humedad:** (pérdida de peso / g Muestra húmeda) x 100

**Pérdida de peso=** peso de crisol+ peso de la muestra- peso del crisol al salir de la estufa.

La determinación de humedad se realizó en *Petroselinum crispum* y *P. sativum* sin tratamiento térmico (0 minutos) y por cocción a vapor durante 5, 15 y 30 minutos, por triplicado.

## **6.5 Pruebas fitoquímicas coloridas para identificación de grupos funcionales**

Las pruebas coloridas se basan en la reacción específica de los grupos funcionales con determinados reactivos para dar reacciones o derivados con color. Estas pruebas son útiles por su sencillez, sensibilidad, especificidad y rapidez de realización. La formación de color se tomó como resultado positivo e indicó la presencia del compuesto en cuestión.

Para la identificación de metabolitos secundarios por pruebas cualitativas en *Petroselinum crispum* y *P. sativum* se utilizó la metodología descrita por Domínguez (1988).

**Coumarinas (Prueba de Hidróxido de Potasio).** Se disolvieron 2 mg de la muestra en una solución de KOH al 10%, se agregaron unas gotas a la muestra, la aparición de una coloración amarilla que desaparece al acidular se considera positiva.

**Flavonoides (Prueba de Salkowski).** Se disolvieron 2 mg de muestra en 1 mL de cloroformo y se agregó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, la prueba es positiva para flavonas y flavonoles si se observan coloraciones amarillas; para

flavonas coloraciones naranja-ginda, para chalconas coloraciones rojo-azuloso y la presencia de quinonas se detecta con coloraciones rojo-púrpura.

**Óxidos fenólicos-Taninos (Prueba de Cloruro Férrico).** Se tomaron 2 mg de la muestra, se mezclaron con 1 mL de agua o etanol y se le adicionaron unas gotas de cloruro férrico al 5%, la aparición de un precipitado rojo, azul violeta o verde se considera positivo.

**Insaturaciones (Prueba de Baeyer:  $\text{KMnO}_4$  al 2% en agua).** Se disolvieron 2 mg de la muestra en 1 mL de agua y se añadió gota a gota de una solución de permanganato de potasio al 2% en agua. La prueba era positiva si se observa decoloración o formación de un precipitado café resultado de la formación de bióxido de manganeso.

**Esteroides y terpenos (Prueba de Lieberman-Buchard).** Se disolvieron 2 mg de muestra en un 1 mL de cloroformo, se agregó el reactivo constituido por 1 mL de anhídrido acético más 1 mL de cloroformo y 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. La prueba es positiva para esteroides al observar la aparición de un color azul o morado y para triterpenos con color rojizo en el lapso de 2 horas.

**Grupos carbonilo (Prueba de 2,4-dinitrofenilhidracina).** En un tubo de ensaye se disolvieron 100 mg de 2,4-dinitrofenilhidracina en 10 mL de etanol con 3 mL de HCl y se aforó con agua destilada. Se añadieron unas gotas de este reactivo a 2 mg de muestra disuelta en etanol, la formación de un precipitado amarillo, rojo o naranja indica presencia de grupos carbonilo.

**Azúcares (Prueba de Antronas).** En un tubo de ensaye se colocaron 2 mg de muestra disuelta en agua, por las paredes del tubo se agrega una solución reciente de antrona al 0.2% en ácido sulfúrico concentrado; la prueba es positiva si en la interface aparece un anillo azul-verdoso o violeta.

**Lactonas (Prueba de de NaOH al 10% y HCl).** Se colocaron 2 mg se muestra con solución alcohólica de NaOH al 10%, un color amarillo o anaranjado que se pierde al agregar unas gotas de HCl indicaba la presencia de un anillo lactónico.

**Saponinas (Prueba de espuma).** En un tubo de ensaye se colocó la muestra (1-2 mg) disuelta en 1 mL de agua y se agitó fuertemente. La formación de espuma abundante se considera prueba positiva.

**Sesquiterpenlactonas (Prueba de Baljet).** Se utilizaron dos soluciones que se mezclaron en igual volúmenes antes de usarse. Solución A: se colocó 1 g de ácido pícrico en 100 mL de etanol. Solución B: se agregó 10 g de NaOH en 100 mL de agua destilada. Para la prueba se agregaron 2 mg de la muestra y 3-4 gotas del reactivo, se considera positiva si adquiere una coloración naranja o rojo oscuro.

## **6.6 Determinación de compuestos fenólicos totales**

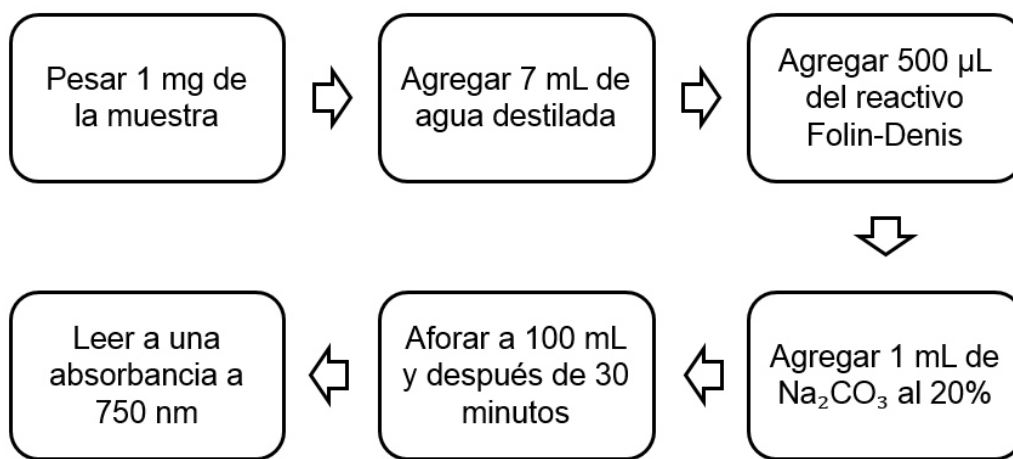
Los polifenoles totales fueron determinados según el método de la AOAC 952.03 (2000) que se describe a continuación.

**Preparación de solución estándar.-** Los polifenoles fueron determinados como equivalentes de ácido gálico. Se pesaron 10 mg de ácido gálico (Sigma-Aldrich) aforados a 100 mL con agua destilada.

**Preparación de la curva estándar.-** Para la curva estándar se tomaron alícuotas de 100-2000  $\mu\text{L}$  de solución estándar de ácido gálico en matraces de aforación de 10 mL que contenían 5 mL de agua destilada. Se agregaron 0.5 mL (500  $\mu\text{L}$ ) de reactivo Folin-Denis (Fluka) y 1 mL (1000  $\mu\text{L}$ )  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (CTR) se aforó a 10 mL con agua destilada, se dejó reposar por 30 minutos y se determinó la absorbancia a 750 nm en el espectrofotómetro Evolution 300 (Thermo Scientific).

**Preparación muestra.-** Se agregó 1 mL de muestra en matraces de aforación de 10 mL que contenían 7.5 mL de agua destilada, se agregó 0.5 mL (500  $\mu$ L) de reactivo Folin-Denis y 1 mL (1000  $\mu$ L)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  se aforó a 10 mL con agua destilada, se dejó reposar por 30 minutos y se determinó la absorbancia a 750 nm en el espectrofotómetro.

En la Figura 7 se presenta el diagrama de la determinación de fenólicos totales.



**Figura 7. Determinación de compuestos fenólicos totales.**

## 6.7 Cuantificación de flavonoides totales

Se utilizó el método descrito por Kostennikova (1983) y modificado por Méndez G. (1996) y se describe a continuación.

**Preparación estándar.-** Como patrón se empleó 0.08 g de quercetina (Sigma-Aldrich), los cuales se disolvieron con etanol (CTR) al 96% hasta completar un volumen de 100 mL; de esta solución se tomó 1 mL y se aforó a 100 mL con etanol al 50%. El blanco consistió en una solución de etanol al 50%.

**Preparación de la muestra.-** En aparato de Goldfish (Labconco, 3500100) se llevó a refluxo 0,5 g de muestra 2 h con 20 mL de ácido sulfúrico (CTR) al 10% y 20 mL de etanol al 50% a una temperatura de 80-90  $^{\circ}\text{C}$ . Luego se enfrió y se

filtró con embudo de Buchner y papel filtro Whatman 1 (100 mm). El residuo se lavó con 30 mL de etanol al 50% para desecharlo finalmente. El filtrado se evaporó en las parrillas electrónicas hasta la mitad del volumen inicial.

La muestra se enfrió sobre baño de hielo durante 30 min y luego se filtró, lavando el precipitado con 4 porciones de 10 mL de agua destilada fría (entre 10 y -15 °C). Se eliminaron el filtrado y los lavados, el residuo tanto del filtro como del recipiente, se disolvió con 70 mL de etanol al 96%, calentado previamente a 50 °C. La solución se pasó a un matraz volumétrico de 100 mL y se completó el volumen con etanol al 96% (solución muestra). Posteriormente se determinó la absorbancia a 258 nm con espectrofotómetro UV-Visible (Beckman Coulter, DU640). La expresión empleada para el cálculo fue la siguiente:

$$X = (A_m \cdot P_r \cdot 5) / A_r \cdot 100$$

Donde:

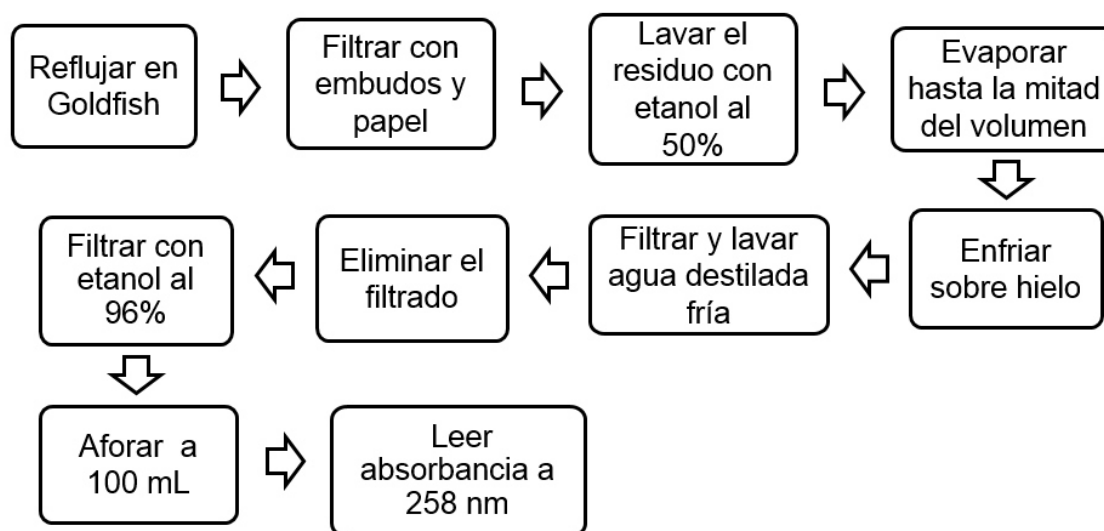
X: Contenido de flavonoides totales expresados como quercetina (%)

$A_m$ = Absorbancia de la solución muestra (nm)

$P_r$ = Peso de la sustancia de referencia (g)

$A_r$ = Absorbancia de la solución referencia (nm)

En la Figura 8 se presenta un esquema de la determinación de flavonoides totales.



**Figura 8. Cuantificación de flavonoides totales.**

## **6.8 Identificación y cuantificación de flavonoides por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)**

### **6.8.1 Curva de calibración de las soluciones estándar**

La técnica para identificar y cuantificar ácido clorogénico, ácido cafeico, miricetina, quercetina, apigenina y kaempferol fue la descrita por Hempel y Bohn (1996) realizando modificaciones en el gradiente de elución y pH de la fase móvil.

Las soluciones estándar y los extractos fueron filtrados con un filtro millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ , se inyectaron al HPLC 10  $\mu\text{L}$  de cada una de las soluciones con concentraciones de 0.001 a 0.2 mg/mL.

### **6.8.2 Análisis de flavonoides por HPLC**

Se utilizó un equipo de HPLC (Spectra System SCM1000, Thermo Electron Corporation) provisto con detector UV/visible y una columna Purospher Star RP-C18 (250 mm x 4.6 mm x 5  $\mu\text{m}$ ) Merck. Se mantuvo una temperatura de 40 °C, longitud de onda UV 354 nm.

Los solventes y el gradiente de elución base utilizados fueron descritos por López y Ortega (2014) con los ajustes que se presentan en la Tabla 5. La fase móvil A esta constituida por agua grado HPLC y ácido acético (2:98) y la fase B por acetonitrilo. Los cromatogramas se corrieron durante 20 minutos variando el volumen de flujo (1 mL/min) para lograr separar los picos y cuantificar cada compuesto en estudio.

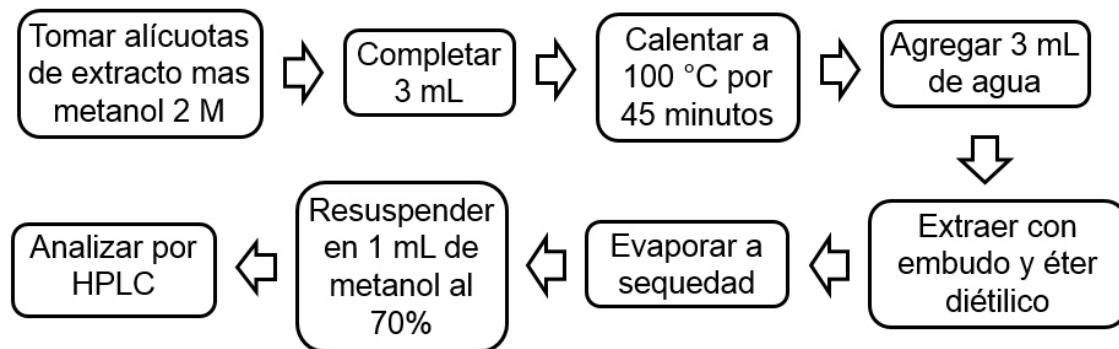
**Tabla 5 Condiciones de flujo del HPLC.**

Tiempo (minutos)	Fase A: Agua-Ácido acético (2:98)	Fase B: Acetonitrilo	Volumen de flujo (mL/min)
0	90	10	1.0
2 a 6.4	55	45	1.0
6.5 a 7	45	55	1.0
7.1 a 7.4	30	70	0.80
7.5 a 8	20	80	0.20
8.1 a 9	30	70	0.50
9.1 a 20	90	10	1.0

### **6.8.3 Hidrólisis de glicósidos de polifenoles**

Para separar las agliconas de los polifenoles presentes en las muestras de perejil se utilizó el método descrito por Taga et al., (1984) con algunas modificaciones que a continuación se describen: se tomaron alícuotas de 100 y 10 mg/mL de extractos y se disolvieron en metanol, se agregaron 2 mL de ácido clorhídrico 2 M grado HPLC (FERMONT) para completar 3 mL. Las muestras fueron cerradas herméticamente y calentadas a 100° C durante 45 minutos en baño seco (Lambnet Internacional, D1200).

Después del calentamiento, se añadieron 3 mL de agua a los viales. Con ayuda de un embudo de separación, se realizó la extracción por triplicado utilizando 2 mL de éter dietílico (CTR) en cada una de ellas, descartando la fase acuosa. Las tres fases de éter se combinaron y fueron evaporadas a sequedad. Por último, el residuo fue resuspendido en 1 mL de metanol 70 % grado HPLC (FERMONT), para su posterior análisis. En la Figura 9 se presenta un diagrama del proceso de hidrólisis de los glicósidos.



**Figura 9. Hidrólisis de glicósidos de polifenoles**

#### **6.8.4 Cuantificación de kaempferol y apigenina con estándar interno**

Se observó que los tiempos de retención entre los flavonoides apigenina y kaempferol eran muy próximos ya que tienen un peso molecular muy similar (270.05 g/mol y 286.23 g/mol respectivamente), la diferencia en su estructura es debido a que el flavonol kaempferol presenta un OH en la posición 3 del anillo C que no posee la apigenina.

Tras experimentar con diferente velocidad de flujo y pH sin lograr una separación completa, se decidió hacer una hidrólisis de las muestras, método descrito por Taga en el apartado 5.7.4 y además adicionar un estándar interno de 0.024 mg/mL kaempferol para lograr cuantificar con precisión el contenido de apigenina. La cuantificación de apigenia se hizo por medio de la siguiente formula:

$$X = \frac{(\text{Contenido de apigenina en la muestra} * \text{peso de la muestra liofilizada})}{0.01} / \text{peso de la muestra fresca}$$

#### **6.9 Análisis estadístico**

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante estadística descriptiva, utilizando medidas de tendencia central (media) y desviación estándar. Se



realizó pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y t de Student para comparar si hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las especies de perejil en cada tiempo de tratamiento térmico, el contenido de polifenoles, flavonoides y apigenina. También se comparó con t de Student el contenido en producto fresco y en senescencia.

Además se hizo el análisis de varianza (ANOVA) a los datos obtenidos en la cuantificación de polifenoles totales, flavonoides totales e identificación de contenido de apigenina para comparar entre los tiempos de tratamiento.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa estadístico SPSS versión 20.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Obtención y rendimiento de extractos

El porcentaje de rendimiento del extracto líquido de las dos especies de perejil en los dos tratamientos térmicos (inmersión en agua y cocción a vapor) y en estado de senescencia se presenta en la Tabla 6. El porcentaje de rendimiento

(%RE) se calculó con la siguiente expresión:

$$\%RE = (\text{Peso final del extracto seco} / \text{Peso inicial de la muestra seca}) * 100$$

**Tabla 6. Porcentaje de rendimiento del extracto líquido.**

Porcentaje de rendimiento (%)									
Tratamiento	Control	Inmersión				Vapor			Senescencia
Tiempo (minutos)	0	1	5	15	30	5	15	30	0
<i>Petroselinum sativum</i>	3.17	12.51	15.64	14.55	17.37	4.63	4.93	5.57	3.68
<i>Petroselinum crispum</i>	5.43	13.84	30.87	34.52	39.22	4.86	6.68	5.65	3.25

n= 3

Se observa que hay diferencia entre las especies de perejil siendo mayor el rendimiento en *Petroselinum crispum*, también se observa que el porcentaje de rendimiento aumenta con el tiempo de los tratamientos, siendo más evidente en el tratamiento térmico por inmersión, donde se incrementa arriba de 500% en *P. sativum* y 700% en *P. crispum* respecto a la muestra control.

### 7.2 Determinación de humedad

Los datos sobre contenido de humedad se utilizaron para expresar los resultados de otras determinaciones analíticas al calcular el contenido de los compuestos de interés ya que al someter la muestra a los tratamientos como los

aquí referidos, las temperaturas altas causan pérdida de humedad, debido a la formación de vapor de agua, así como la caramelización de los azúcares.

Se observó que *P. sativum* fue ganando humedad conforme aumentaba el tiempo de tratamiento térmico por vapor, contrario a esto, en la especie *P. crispum* fue disminuyendo el contenido de humedad conforme el tiempo de tratamiento térmico (Tabla 7). En *P. sativum* aumentó un 1.87% a los 5 minutos hasta 4.82% a los 30 minutos respecto a la muestra control. En *P. crispum* disminuyó un 1.15% a los 5 minutos hasta 2.08% a los 30 minutos respecto a la muestra control.

**Tabla 7. Determinación de humedad *P. sativum* y *P. crispum*.**

Tratamiento	Tiempo (minutos)	Contenido de Humedad (% $\pm$ DS)	
		<i>Petroselinum sativum</i>	<i>Petroselinum crispum</i>
Vapor	Control	79.98 $\pm$ 0.99	82.74 $\pm$ 0.15
	5	81.48 $\pm$ 0.23	81.79 $\pm$ 0.37
	15	82.76 $\pm$ 0.71	81.40 $\pm$ 0.84
	30	83.83 $\pm$ 0.49	81.02 $\pm$ 0.22

n= 3

### 7.3 Grupos funcionales presentes en *P. crispum* y *P. sativum*

El análisis fitoquímico de los extractos acuosos de las muestras frescas sin tratamiento térmico (control) y de las muestras con tratamiento térmico por inmersión a 100 °C y por vapor (Tabla 8), en ambas especies de perejil mostraron la presencia de 8 diferentes grupos funcionales entre ellos flavonoides y óxidos fenólicos. En la misma tabla se muestra que estos compuestos permanecieron estables después de 5 minutos de tratamiento térmico (inmersión y cocción a vapor), así como en las muestras en estado de senescencia.

**Tabla 8. Contenido de grupos funcionales en *P. sativum* y *P. crispum* en extracto líquido.**

<i>Petroselinum sativum</i>					<i>Petroselinum crispum</i>			
Grupo funcional	Sin tratamiento	Tratamiento térmico por 5 minutos		Senescencia	Sin tratamiento	Tratamiento térmico por 5 minutos		Senescencia
		Inmersión	Vapor			Inmersión	Vapor	
Coumarinas	+	+	+	+	+	+	+	+
Flavonoides	+	+	+	+	+	+	+	+
Óxidos Fenólicos	+	+	+	+	+	+	+	+
Insaturaciones	+	+	+	+	+	+	+	+
Esteroides y terpenos	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupos carbonilo	+	+	+	+	+	+	+	+
Azúcares	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactonas	+	+	+	+	+	+	+	+
Saponinas	+	+	+	+	+	+	+	+

n= 3

#### 7.4 Contenido de compuestos fenólicos en extractos de perejil

Para determinar si los polifenoles y los flavonoides que contiene el perejil permanecen en el tejido celular o se solubilizan en el agua de cocción, se analizó el contenido de estos compuestos bioactivos en ambos extractos (líquido y sólido).

En la Tabla 9 se observa que en el extracto líquido contiene 75.76% y 74.30% de los polifenoles totales de *P. sativum* y *P. crispum* respectivamente, de igual manera el contenido mayoritario de flavonoides se encuentra en el extracto líquido con un 82.12% y 84.77% para *P. sativum* y *P. crispum* respectivamente.

**Tabla 9. Polifenoles y flavonoides totales en dos especies de perejil fresco.**

		<b>Polifenoles totales (mg de ácido gálico/100g)</b>	<b>Flavonoides totales (% de quercetina)</b>
<b><i>Petroselinum sativum</i></b>	Extracto líquido	5.91 ± 0.37	4.87 ± 0.35
	Extracto sólido	1.90 ± 0.74	1.06 ± 0.27
	<b>Total</b>	<b>7.80 ± 1.11</b>	<b>5.93 ± 0.62</b>
<b><i>Petroselinum crispum</i></b>	Extracto líquido	5.87 ± 0.52	3.23 ± 0.45
	Extracto sólido	2.04 ± 0.08	0.58 ± 0.22
	<b>Total</b>	<b>7.90 ± 0.60</b>	<b>3.81 ± 0.67</b>

n= 3

Al comparar el efecto del tratamiento térmico en el extracto líquido, se encontró que con un minuto de calentamiento por inmersión a 100 °C el contenido de polifenoles totales aumenta. En *P. sativum* aumenta el porcentaje que se encuentra en el extracto líquido hasta 56.34%, similares resultados se presentan en *P. crispum* con un incremento de hasta 88.41% de polifenoles totales respecto a la muestra control.

De igual forma el contenido de flavonoides totales se incrementa al someterlo a un minuto de tratamiento térmico de 7.73 y 19.07 veces en *P. sativum* y *P. crispum* respectivamente en el extracto soluble (líquido) como se observa en las Tablas 9 y 10.

**Tabla 10. Polifenoles y flavonoides totales en dos especies de perejil con tratamiento térmico (un minuto a 100 °C).**

		<b>Polifenoles totales (mg de ácido gálico/100g)</b>	<b>Flavonoides totales (% de quercetina)</b>
<b><i>Petroselinum sativum</i></b>	Extracto líquido	15.15 ± 0.36	37.65 ± 3.87
	Extracto sólido	1.34 ± 0.15	3.28 ± 0.37
	<b>Total</b>	<b>16.49 ± 0.51</b>	<b>40.93 ± 4.24</b>
<b><i>Petroselinum crispum</i></b>	Extracto líquido	16.93 ± 1.64	61.64 ± 0.61
	Extracto sólido	1.99 ± 0.24	7.35 ± 0.88
	<b>Total</b>	<b>19.63 ± 1.88</b>	<b>68.99 ± 1.49</b>

n= 3

Es posible que el incremento de la temperatura aumente la solubilización de los compuestos y/o que el cambio en la textura (reblandecimiento del tejido) sea la causa del aumento del contenido en el extracto líquido.

#### **7.4.1 Efecto de tiempo de calentamiento en el contenido de polifenoles totales**

Es importante señalar que aunque el contenido de polifenoles en el extracto líquido era igual en las dos especies de perejil sin ningún tratamiento térmico, no es así en los diferentes tiempos de tratamiento por inmersión donde se observa que *P. crispum* contiene significativamente ( $p<0.05$ ) mayor cantidad de polifenoles. También se presenta diferencia significativa ( $p<0.05$ ) en el tratamiento con vapor a los 5 y 30 minutos de tratamiento (Tabla 11).

El tratamiento térmico por inmersión a 100 °C aumenta los polifenoles presentes en el extracto líquido como se observa en la Tabla 11. En *P. sativum* se presenta un incremento significativo ( $p<0.05$ ) respecto a la muestra control cuando se aplica un minuto de tratamiento. Al aumentar el tiempo de tratamiento térmico la concentración de polifenoles fue disminuyendo aunque no de manera significativa.

En *P. crispum* el mayor incremento respecto a la muestra control también se presentó después de un minuto de tratamiento térmico (estadísticamente significativo), igualmente se observó una disminución de contenido de polifenoles al incrementar el tiempo de tratamiento térmico aunque no de manera significativa.

**Tabla 11. Polifenoles totales de *P. sativum* y *P. crispum* en el extracto líquido.**

Tratamiento	Tiempo (minutos)	<i>Petroselinum sativum</i> ** (mg de ácido gálico/100g)	<i>Petroselinum crispum</i> ** (mg de ácido gálico /100g)
Inmersión	Control	5.91 ± 0.37 <sup>a</sup>	5.87 ± 0.52 <sup>a</sup>
	1*	15.15 ± 0.36 <sup>b</sup>	17.64 ± 1.64 <sup>b</sup>
	5*	14.83 ± 0.29 <sup>b</sup>	16.64 ± 0.94 <sup>b</sup>
	15*	14.45 ± 0.38 <sup>b</sup>	15.92 ± 0.12 <sup>b</sup>
	30*	14.02 ± 0.71 <sup>b</sup>	15.65 ± 0.27 <sup>b</sup>
Vapor	Control	5.91 ± 0.37 <sup>a</sup>	5.87 ± 0.52 <sup>a</sup>
	5*	7.82 ± 0.42 <sup>b</sup>	6.01 ± 0.12 <sup>a</sup>
	15	6.63 ± 0.71 <sup>ab</sup>	6.46 ± 0.26 <sup>a</sup>
	30*	8.84 ± 0.54 <sup>b</sup>	6.11 ± 0.19 <sup>a</sup>

n= 3

\*Superíndices indican diferencia significativa (p<0.05) entre las especies de *Petroselinum*.

\*\* Superíndices diferentes en las columnas inferiores indican diferencia significativa (p<0.05) entre los tiempos de tratamiento térmico.

Por otra parte cuando el tratamiento térmico se realiza con vapor en *P. sativum* el contenido de polifenoles incrementa significativamente (p<0.05) a los 5 minutos de tratamiento respecto a la muestra control, por último se presenta una disminución entre los tiempos de 5 a 15 minutos y posteriormente un aumento de 15 a 30 minutos sin presentar diferencia significativa. En *P. crispum* se observa un ligero aumento a los 5 minutos de tratamiento térmico, teniendo el mismo comportamiento que la especie *P. sativum* pero sin presentar diferencia significativa entre los tiempos de tratamiento térmico.

Al analizar los extractos sólidos como se muestra en la Tabla 12 se encontró diferencia estadísticamente significativa (p<0.05) en el contenido de polifenoles totales entre las especies de perejil únicamente en tratamiento térmico por inmersión en los tiempos 1 y 5 minutos. Así mismo se observa que el contenido de polifenoles en el extracto sólido se reduce con los tratamientos térmicos en el perejil, presentando un efecto contrario a lo observado en el extracto líquido.

**Tabla 12. Polifenoles totales de *P. sativum* y *P. crispum* en el extracto sólido.**

Tratamiento	Tiempo (minutos)	<i>Petroselinum sativum</i> (mg de ácido gálico /100g)	<i>Petroselinum crispum</i> (mg de ácido gálico /100g)
Inmersión	Control	2.10 ± 0.74 <sup>a</sup>	2.06 ± 0.08 <sup>a</sup>
	1*	1.31 ± 0.15 <sup>a</sup>	2.02 ± 0.24 <sup>a</sup>
	5*	1.33 ± 0.18 <sup>a</sup>	2.21 ± 0.38 <sup>a</sup>
	15	1.26 ± 0.20 <sup>a</sup>	1.89 ± 0.59 <sup>a</sup>
	30	1.34 ± 0.21 <sup>a</sup>	1.99 ± 0.44 <sup>a</sup>
Vapor	Control	2.10 ± 0.74 <sup>b</sup>	2.06 ± 0.08 <sup>b</sup>
	5	0.56 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.34 <sup>a</sup>
	15	0.94 ± 0.33 <sup>ab</sup>	0.61 ± 0.49 <sup>a</sup>
	30	0.46 ± 0.41 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.38 <sup>a</sup>

n= 3

\*Superíndices indican diferencia significativa (p<0.05) entre las especies de *Petroselinum*.

\*\* Superíndices diferentes en las columnas inferiores indican diferencia significativa (p<0.05) entre los tiempos de tratamiento térmico

En el extracto sólido de *P. sativum* en tratamiento por inmersión los cambios en el contenido de polifenoles totales no fueron estadísticamente significativos, aunque se observa una reducción desde un minuto de tratamiento respecto a la muestra control, esta disminución se mantiene en los siguientes tiempos de calentamiento.

En *P. crispum* se presenta un fenómeno similar, los cambios en el contenido de polifenoles totales no son estadísticamente significativos, teniendo un aumento mínimo a los 5 minutos de tratamiento térmico respecto a la muestra control y una reducción al incrementarse el tiempo de calentamiento.

Por otra parte, al analizar los cambios generados por el tratamiento térmico con vapor se encontró que en el extracto sólido disminuyeron los polifenoles respecto a la muestra control como se muestra en la Tabla 12. En *P. sativum* los cambios en el contenido de polifenoles entre los tiempos fue estadísticamente significativa (p<0.05), hubo una reducción a los 5 minutos de tratamiento térmico



respecto a la muestra control, se observa un incremento entre los tiempos de 5 a 15 minutos y una posterior disminución entre los 15 y 30 minutos

En *P. crispum* se presenta una reducción estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) a los 5 minutos de tratamiento térmico respecto a la muestra control, los cambios en el contenido de polifenoles entre los tiempos subsiguientes no fue significativa.

#### **7.4.2 Efecto de tiempo de calentamiento en el contenido de flavonoides totales**

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en el contenido de flavonoides entre los extractos líquidos de las especies de perejil en producto fresco (control) y en las sometidas a tratamiento térmico por inmersión en los cuatro tiempos de cocción y únicamente a los 30 minutos de tratamiento por vapor (Tabla 13).

En tratamiento térmico por inmersión en *P. sativum* se presenta un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) desde un minuto de tratamiento térmico con respecto a la muestra control, al continuar en el tratamiento térmico se observa una disminución de contenido, aunque no de manera significativa.

En *P. crispum* se presenta un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) aún mayor que en la otra especie a un minuto de tratamiento térmico respecto a la muestra control, teniendo una disminución no significativa en los subsiguientes tiempos de tratamiento (Tabla 13).

**Tabla 13. Flavonoides totales de *P. sativum* y *P. crispum* en el extracto líquido.**

Tratamiento	Tiempo (minutos)	<i>Petroselinum sativum</i> ** (% de quercetina)	<i>Petroselinum crispum</i> ** (% de quercetina )
Inmersión	Control*	4.87 ± 0.35 <sup>a</sup>	3.23 ± 0.45 <sup>a</sup>
	1*	37.65 ± 3.87 <sup>b</sup>	61.64 ± 0.61 <sup>d</sup>
	5*	34.98 ± 6.05 <sup>b</sup>	60.31 ± 2.15 <sup>d</sup>
	15*	32.44 ± 2.63 <sup>b</sup>	55.07 ± 2.50 <sup>c</sup>
	30*	31.90 ± 1.99 <sup>b</sup>	40.63 ± 1.30 <sup>b</sup>
Vapor	Control*	4.87 ± 0.35 <sup>b</sup>	3.23 ± 0.45 <sup>a</sup>
	5	4.43 ± 0.42 <sup>b</sup>	3.99 ± 0.18 <sup>ab</sup>
	15	4.41 ± 0.71 <sup>b</sup>	3.65 ± 0.58 <sup>ab</sup>
	30*	3.12 ± 0.54 <sup>a</sup>	4.41 ± 0.34 <sup>b</sup>

n= 3

\*Superíndices indican diferencia significativa (p<0.05) entre las especies de *Petroselinum*.

\*\* Superíndices diferentes en las columnas inferiores indican diferencia significativa (p<0.05) entre los tiempos de tratamiento térmico

En el tratamiento térmico por vapor el extracto líquido de *P. sativum* disminuye los flavonoides respecto a la muestra control sin presentar diferencia significativa durante los 5 y 15 minutos de tratamiento, aunque se observa una reducción significativa (p<0.05) con 30 minutos de tratamiento térmico. En *P. crispum* se presenta un aumento no significativo a los 5 y 15 minutos de tratamiento térmico. Este incremento en el contenido de flavonoides se acentúa a los 30 minutos de tratamiento térmico (Tabla 13).

Como se muestra en la Tabla 14 el contenido de flavonoides totales en el extracto sólido incrementa con el tratamiento térmico por inmersión. Se observa diferencia estadísticamente significativa (p<0.05) entre las especies de perejil únicamente en tratamiento térmico por inmersión en los tiempos 1, 5 y 15 minutos. Es importante señalar que en los productos frescos (sin tratamiento) el contenido es mayor en *P. sativum*, mientras que en los demás tiempos (1, 5, 15 y 30 minutos) se encuentran más flavonoides en *P. crispum*.

**Tabla 14. Flavonoides totales de *P. sativum* y *P. crispum* en el extracto sólido.**

Tratamiento	Tiempo (minutos)	<i>Petroselinum sativum</i> (% de quercetina)	<i>Petroselinum crispum</i> (% de quercetina)
Inmersión	Control	1.06 ± 0.27 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.22 <sup>a</sup>
	1*	3.28 ± 0.37 <sup>b</sup>	7.35 ± 0.88 <sup>b</sup>
	5*	3.14 ± 0.42 <sup>b</sup>	7.92 ± 1.37 <sup>b</sup>
	15*	3.01 ± 0.43 <sup>b</sup>	6.51 ± 2.04 <sup>b</sup>
	30	3.36 ± 0.52 <sup>b</sup>	5.21 ± 1.15 <sup>b</sup>
Vapor	Control	1.06 ± 0.27 <sup>b</sup>	0.58 ± 0.22 <sup>a</sup>
	5	0.28 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.17 <sup>a</sup>
	15	0.47 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.30 ± 0.24 <sup>a</sup>
	30	0.23 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.29 ± 0.19 <sup>a</sup>

n= 3

\*Superíndices indican diferencia significativa (p<0.05) entre las especies de *Petroselinum*.

\*\* Superíndices diferentes en las columnas inferiores indican diferencia significativa (p<0.05) entre los tiempos de tratamiento térmico

El tratamiento térmico por inmersión en el extracto sólido en *P. sativum* presenta un aumento estadísticamente significativo (p<0.05) a un minuto de tratamiento respecto a la muestra control, sin cambio significativo en el contenido de flavonoides a mayor tiempo de tratamiento. Resultados similares se presentan en *P. crispum* donde el aumento es altamente significativo (p<0.05) desde un minuto de tratamiento con respecto a la muestra control, los cambios de contenido de flavonoides no fueron significativos entre los tiempos posteriores (Tabla 14).

El tratamiento térmico por vapor en extracto sólido se comportó igual a el extracto líquido teniendo una disminución significativa (p<0.05) de los flavonoides en *P. sativum* a los 5 minutos de cocción respecto a la muestra control, sin presentar cambios al continuar con el tratamiento térmico. En *P. crispum* se observa una disminución de aproximadamente la mitad a los 5 minutos de tratamiento térmico, sin embargo esta disminución no es significativa (Tabla 14).

### 7.4.3 Efecto de la senescencia en los compuestos fenólicos

La senescencia afecta un sinnúmero de procesos metabólicos en las plantas, esto se ve reflejado en el cambio de la concentración de metabolitos. En el presente estudio se encontró que el contenido de polifenoles y flavonoides en el extracto líquido no presenta diferencia significativa entre las dos especies estudiadas en los vegetales en estado fresco y en senescencia (Tabla 15).

En *P. sativum* en estado de senescencia respecto a la muestra control presentó una disminución en el contenido de polifenoles de un 10.55% y en *P. crispum* se encontró una disminución menor (2.79%). Estas reducciones no son estadísticamente significativas (Tabla 15).

Por otra parte la concentraciones de flavonoides totales en el extracto líquido mostró una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) como se muestra en la Tabla 15, en *P. sativum* en senescencia respecto a la muestra control se observó una disminución de un 21.57% mientras que en *P. crispum* se observa un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de 38.08%.

**Tabla 15. Efecto de la senescencia en el extracto líquido.**

Compuesto fenólico		<i>Petroselinum sativum</i>	<i>Petroselinum crispum</i>
Polifenoles totales (mg de ácido gálico /100g)	<b>Fresco (control)</b>	5.91 ± 0.37	5.87 ± 0.52
	<b>Senescencia</b>	5.29 ± 0.57	5.71 ± 0.02
Flavonoides totales (% de quercetina)	<b>Fresco (control)*</b>	4.87 ± 0.35 <sup>a</sup>	3.23 ± 0.45 <sup>a</sup>
	<b>Senescencia</b>	3.82 ± 0.27 <sup>b</sup>	4.46 ± 0.53 <sup>b</sup>

n=3

\* Superíndices diferentes en las columnas inferiores indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tiempos de tratamiento térmico.

En el extracto sólido los contenidos de polifenoles totales y flavonoides totales no presentaron diferencia estadísticamente significativa entre las dos especies de *Petroselinum* estudiadas en estado de senescencia respecto a la muestra control (Tabla 16).

**Tabla 16. Efecto de la senescencia en el extracto sólido.**

<b>Compuesto fenólico</b>		<b><i>Petroselinum sativum</i></b>	<b><i>Petroselinum crispum</i></b>
Polifenoles totales (mg de ácido gálico /100g)	<b>Fresco (control)</b>	2.10 ± 0.74	2.06 ± 0.08
	<b>Senescencia</b>	1.99 ± 0.76	2.09 ± 0.11
Flavonoides totales (% de quercetina)	<b>Fresco (control)</b>	1.06 ± 0.27	0.58 ± 0.22
	<b>Senescencia</b>	0.83 ± 0.24	0.72 ± 0.19

n= 3

\*Superíndices indican diferencia significativa (p<0.05) entre las especies de *Petroselinum*.

\*\* Superíndices diferentes en las columnas inferiores indican diferencia significativa (p<0.05) entre los tiempos de tratamiento térmico

#### **7.4.4 Identificación y cuantificación de flavonoides por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

##### **7.4.4.1 Estandarización del método de cuantificación de flavonoides**

La estandarización del método para la cuantificación se logró mediante la curvas de calibración de los siguientes estándares; ácido clorogénico, ácido cafeico, miricetina, quercetina y kaempferol en concentraciones de 0.001 a 0.2 mg/mL, mientras que para apigenina se utilizaron concentraciones de 0.002 a 2 mg/mL (Tabla 17). Se utilizó el equipo y las condiciones de trabajo descritas en el apartado 5.7 de Metodología del presente documento.

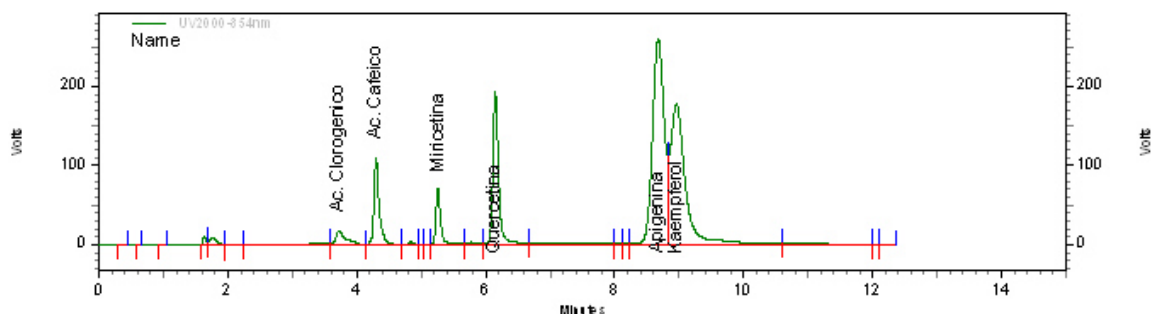
**Tabla 17. Curvas de calibración y coeficientes de regresión de los estándares.**

<b>Estándares</b>	<b>Curva de calibración</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
1. Ácido Clorogénico	1.82266e-007x + -0.00291189	0.993756
2. Ácido Cafeico	5.91969e-008x + -0.00448790	0.994600
3. Miricetina	5.85405e-008x + -0.00523324	0.996037
4. Quercetina	1.82244e-008x + -0.00336770	0.997096
5. Apigenina	5.65677e-008x + -0.0206427	0.994288
6. Kaempferol	2.31376e-008x + -0.00382107	0.995689

Los tiempos de retención, límites de detección y límites de cuantificación de los diferentes estándares se presentan en la Tabla 18. En la Figura 10 se presenta el cromatograma de los estándares de los flavonoides utilizados en el presente estudio. Las gráficas de las curvas de calibración de los estándares se presentan en el Anexo A.

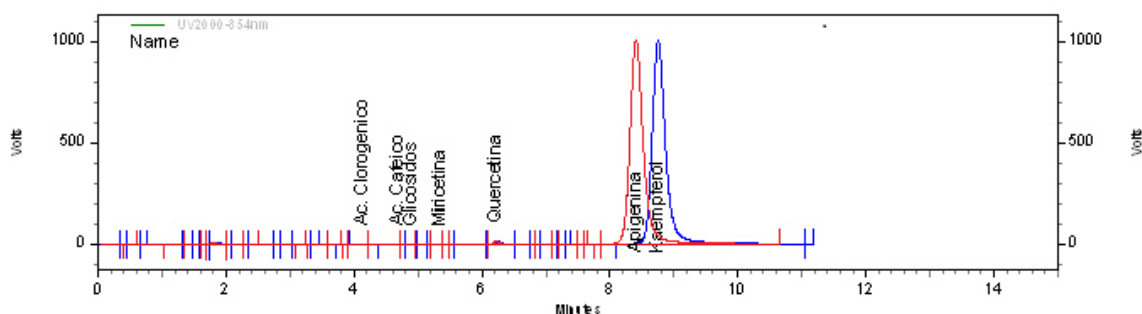
**Tabla 18. Tiempo de retención, límites de detección y cuantificación de los estándares de compuestos fenólicos.**

<b>Estándar</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>Límite de detección (mg/mL)</b>	<b>Límite de cuantificación (mg/mL)</b>
1. Ácido Clorogénico	3.875	0.00004	0.0003
2. Ácido Cafeico	4.440	0.0002	0.001
3. Miricetina	5.352	0.0003	0.001
4. Quercetina	6.123	0.00002	0.0005
5. Apigenina	8.693	0.0007	0.0009
6. Kaempferol	9.003	0.00003	0.0006



**Figura 10. Cromatograma de estándares flavonoides.**

Los estándares apigenina y kaempferol con una velocidad de flujo 1 mL/min presentaron tiempos de retención muy próximos entre ellos de 8.380 y 8.753 minutos respectivamente (Figura 10). Por lo que se decidió cambiar las condiciones del flujo (0.43 mL/min) donde los tiempos de retención para estos dos flavonoides fueron 8.693 y 9.003 respectivamente logrando una mejor separación de los picos, como se muestra en la Figura 11.



**Figura 11. Cromatograma de estándar de apigenina y kaempferol.**

#### 7.4.4.2 Análisis de flavonoides por HPLC

Los flavonoides específicos se analizaron en las dos especies de perejil fresco, con tratamiento térmico por inmersión a 100 °C (1, 5, 15 y 30 minutos), tratamiento térmico por vapor (5, 15 y 30 minutos) muestra control (fresco y sin tratamiento térmico) solo en el extracto líquido ya que ésta contenía más del

80% de los compuestos fenólicos de la planta (resultados ya presentados en Tabla 9).

En el extracto líquido (sin hidrólisis) se encontraron valores inferiores al límite de detección para ácido cafeico, miricetina y quercetina presentes como agliconas y solo se detectaron ácido clorogénico, apigenina y kaempferol, también se encontró una gran cantidad de glicósidos (Figura 12).

En la siguiente Tabla 19 se muestra la cuantificación de los compuestos fenólicos individuales de *P. sativum* y *crispum* por tratamiento térmico por inmersión a 100 °C durante un minuto.

**Tabla 19. Cuantificación de compuestos fenólicos en las especies de perejil por tratamiento térmico por inmersión a 100 °C durante un minuto.**

Flavonoides	<i>Petroselinum sativum</i> (mg/g)		<i>Petroselinum crispum</i> (mg/g)	
	Sin hidrólisis	Con hidrólisis	Sin hidrólisis	Con hidrólisis
1. Ácido Clorogénico	< 0.0003	ND	< 0.0003	ND
2. Ácido Cafeico	ND	< 0.001	ND	< 0.001
3. Miricetina	ND	< 0.001	ND	< 0.001
4. Quercetina	ND	< 0.0005	ND	< 0.0005
5. Apigenina	< 0.0009	6.610 ± 0.57	< 0.0009	9.503 ± 1.91
6. Kaempferol	< 0.0006	0.083 ± 0.01*	< 0.0006	0.103 ± 0.01*

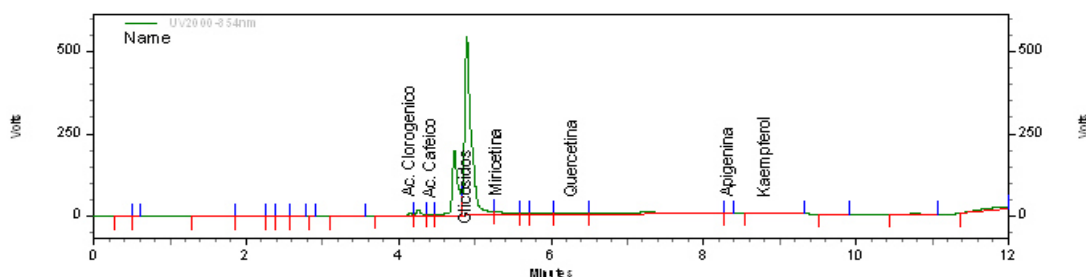
n= Tres muestras independientes analizadas por triplicado.

ND= Valores inferiores al límite de detección.

\* = Cuantificación total de kaempferol (sin estándar interno).

En la Figura 12 se observa en el cromatograma un pico que corresponde a glicósidos con un tiempo de retención de 4.932 minutos. Para identificar si los glicósidos pertenecían a los flavonoides investigados se realizó una hidrólisis para separar los azúcares y liberar las agliconas (apartado 5.7.4 de Metodología).



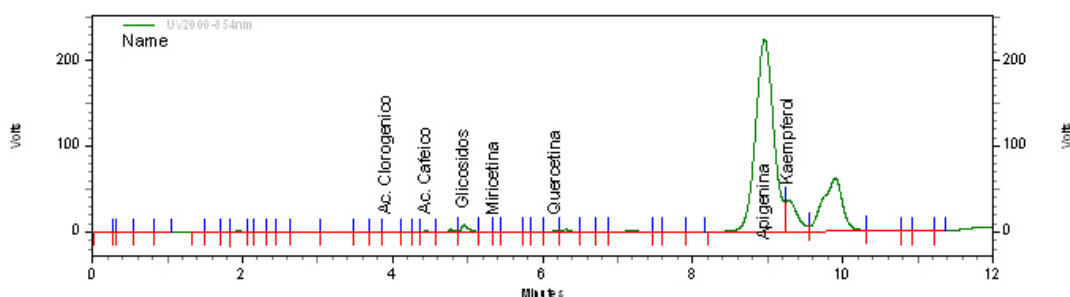


**Figura 12. Cromatograma de *P. crispum* sin hidrólisis por tratamiento térmico por inmersión durante un minuto a 100 °C.**

#### 7.4.4.3 Hidrólisis de glicósidos de polifenoles

Se hidrolizaron las muestras para cuantificar las concentraciones de los flavonoides que se encontraban en forma conjugada con azúcares (glicósidos). Los resultados obtenidos fueron valores detectables pero inferiores al límite de cuantificación para ácido cafeico, miricetina y quercetina como se observa en la Tabla 19. Solo fue posible cuantificar el contenido de apigenina y kaempferol, donde la flavona apigenina fue la de mayor concentración (Tabla 19).

En la Figura 13 se observa un cromatograma donde se observa el contenido de estos flavonoides específicos, además presenta un pico con tiempo de retención 9.8, que en base a la literatura puede ser la flavona crisoeiriol, la cual se encuentra en mayor cantidad que el kaempferol.



**Figura 13. Cromatograma de *P. crispum* con hidrólisis por tratamiento térmico por inmersión durante un minuto a 100 °C.**

#### 7.4.4.4 Cuantificación de apigenina

Los resultados del contenido de apigenina en los diferentes tratamientos térmicos se presentan en la Tabla 20 donde se observa que el tratamiento térmico por inmersión a 100 °C aumenta significativamente ( $p<0.05$ ) el contenido de la apigenina presente en el extracto líquido. Los datos muestran que existe diferencia significativa ( $p<0.05$ ) entre las especies de *Petroselinum*. Además, en ambas especies *P. sativum* y *P. crispum* se observan un incremento estadísticamente significativo ( $p<0.05$ ) de apigenina entre la muestra control y tratamiento térmico por un minuto. Es importante destacar que en *P. crispum* el incremento fue de mayor magnitud con respecto a *P. sativum*.

**Tabla 20. Contenido de apigenina en *P. sativum* y *P. crispum*.**

Tratamiento	Tiempo (minutos)	<i>Petroselinum sativum</i> ** (mg/g)	<i>Petroselinum crispum</i> ** (mg/g)
Inmersión	Control*	$0.11 \pm 0.02^a$	$0.07 \pm 0.01^a$
	1*	$6.61 \pm 0.57^b$	$9.50 \pm 1.91^c$
	5	$6.30 \pm 0.09^b$	$6.46 \pm 0.46^b$
	15	$6.18 \pm 0.22^b$	$6.09 \pm 0.76^b$
	30	$6.06 \pm 0.52^b$	$5.29 \pm 0.74^b$
Vapor	Control*	$0.11 \pm 0.02^{ab}$	$0.07 \pm 0.01^c$
	5*	$0.13 \pm 0.01^b$	$0.055 \pm 0.00^b$
	15*	$0.11 \pm 0.01^{ab}$	$0.062 \pm 0.00^{bc}$
	30*	$0.09 \pm 0.01^a$	$0.02 \pm 0.00^a$

n=9

\*Superíndices indican diferencia significativa ( $p<0.05$ ) entre las especies de *Petroselinum*.

\*\* Superíndices diferentes en las columnas inferiores indican diferencia significativa ( $p<0.05$ ) entre los tiempos de tratamiento térmico

Al analizar el efecto del tratamiento térmico en *P. sativum* entre los subsecuentes tiempos se observa una reducción no significativa del contenido de apigenina. En *P. crispum* se observa una disminución de contenido de apigenina estadísticamente significativo ( $p<0.05$ ) al incrementar los tiempos de

tratamiento térmico de 1 a 5 minutos, la disminución de contenido entre los subsecuentes tiempos no fueron significativos.

El contenido de apigenina cuando se utiliza vapor muestra un comportamiento variable, muy similar al presentado por los polifenoles y flavonoides totales, quizás sea debido a una falta de homogeneidad en la distribución del calor durante el tratamiento. Se observó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las especies en los tres tiempos de calentamiento térmico.

En *P. sativum* el cambio de contenido de apigenina no es estadísticamente significativo entre la muestra fresca y los 5 y 15 minutos de cocción solo entre 5 y 30 minutos. En *P. crispum* se encontró una reducción significativa ( $p < 0.05$ ) solo con calentamiento a vapor por 30 minutos. Se observó que en el tiempo 15 de este tratamiento térmico en la especie *P. sativum* disminuyó mientras que aumento en *P. crispum*.

#### 7.4.5 Efecto de la senescencia en el contenido de apigenina

Los resultados presentados en la Tabla 21 muestran un incremento de apigenina estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en el extracto líquido en *P. sativum* en estado de senescencia respecto a la muestra control y en *P. crispum* también se encontró un incremento pero de menor magnitud.

**Tabla 21. Efecto del contenido de apigenina del perejil en senescencia.**

	<i>Petroselinum sativum</i> (mg/g)	<i>Petroselinum crispum</i> (mg/g)
<b>Fresco (control)*</b>	$0.11 \pm 0.02^a$	$0.07 \pm 0.01^a$
<b>Senescencia*</b>	$0.32 \pm 0.02^b$	$0.14 \pm 0.03^b$

n=9

\*Superíndices indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las especies de *Petroselinum*.

\*\* Superíndices diferentes en las columnas inferiores indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tiempos de tratamiento térmico

## 8 DISCUSION

Los vegetales son fuente de vitaminas, minerales y una gran cantidad de compuestos bioactivos. Es común consumir estos productos con algún proceso de cocción, lo que modifica el contenido y la biodisponibilidad de estos compuestos. Se conoce bien que los tratamientos térmicos destruyen parte de las vitaminas pero por otra parte el calor puede desarrollar cambios positivos en otros compuestos como los flavonoides.

Kumar y Pandey (2013) mencionan que la preparación y procesamiento de los alimentos pueden disminuir los niveles de flavonoides, dependiendo el método utilizado. Kamel (2013) recomienda que se deben evaluar los métodos de procesamiento a fin de preservar las propiedades de los diferentes nutrientes y compuestos deseables como antioxidantes de los alimentos. Lo que nos lleva a analizar el efecto de los tratamientos térmicos sobre el contenido en los compuestos fenólicos presentes en el perejil.

### 8.1 Contenido de humedad

Akpınar, Bicer y Cetinkaya (2006) reportan que el contenido de humedad en *P. crispum* es de 84% y García, Rugel, Rodríguez y Vargas (2010) reportan en la misma especie una humedad es de 88%. Esta variación puede ser debida a las condiciones climáticas donde fue obtenida la muestra ya que corresponden a Turquía y Colombia, respectivamente. Además García y colaboradores (2010) relacionan el contenido elevado de humedad en las muestras analizadas con la época y temporada de cosecha ya que esta fue altamente lluviosa.

Los valores de humedad encontrados en el presente trabajo fueron de 82 % para la misma especie. Por otra parte Leahu, Damian, Oroian, Miclecu y Ropciuc (2013) reportaron en *P. sativum* un contenido de humedad de 83% en muestras de Rumania, valores ligeramente superiores a los encontrados en el presente estudio.

Entre los factores que afectan el contenido de humedad se encuentran lugar de cultivo, época del año, condiciones ambientales como volumen de precipitación, etc. Estos factores también pueden afectar el contenido de otros de los componentes químicos de la planta como vitaminas, pigmentos, entre otros.

## **8.2 Contenido de polifenoles**

El contenido de polifenoles ha sido reportado por Kaiser (2012) reporta en extracto líquido de *P. crispum* de Alemania es de 87.3 mmol GAE/kg de polifenoles sin tratamiento térmico (control), lo que representa 1.49 mg/100g. En el presente estudio se encontró para la misma especie un contenido de 5.87 mg GAE/100g lo que representa, 3.9 veces más contenido de polifenoles totales en muestra fresca. Mientras que Al-Juhaimi y Ghafoor (2011) en extracto con éter dietílico por agitación de *P. crispum* de Arabia Saudita reporta que el contenido de polifenoles totales es de 1.22 mg GAE/100mL.

En el presente estudio la especie *P. sativum* fresco (control) tuvo 5.91 mg GAE/100g, Mercado-Mercado, de La Rosa Carillo y Wall-Medrano (2013) mencionan que *P. sativum* tiene un contenido de 29.2 mg GAE/100 g, esto sería 4.9 veces más contenido de polifenoles totales que nuestra muestra, esto puede ser debido a las condiciones de cultivo.

## **8.3 Contenido de flavonoides totales**

Otros autores que han reportado flavonoides en perejil, por ejemplo Marinova (2005) encontró que en un extracto metanólico obtenido por baño ultrasónico de *P. sativum* se encontraban 27.2 mg equivalente de catequina (CE)/100g de flavonoides totales. Mientras que Stankevičius, Akuņeca, Jākobsone y Maruška (2010) reportó en extracto etanólico por agitación en hojas de *P. crispum* 119 mg equivalente de catequina (CE)/100g de flavonoides totales.

En el presente estudio se encontraron flavonoides en muestras sin tratamiento térmico en un 4.87% de quercetina en *P. sativum* y 3.23% de quercetina en *P. crispum*, sin embargo, estos resultados no pueden ser comparados debido que se utilizaron diferentes solventes y métodos de extracción y tal como fue demostrado por Trifunski y Ardelean (2012) el solvente de extracción afecta en el contenido de flavonoides, esto fue observado en *P. crispum*, donde las muestras con etanol contienen un 40.33% más que las muestras con metanol.

Como ya se describió previamente, las condiciones, procedimientos y sustancias de extracción de las plantas influyen en los compuestos fenólicos, principalmente la temperatura la cual impacta en la solubilidad, el coeficiente de difusión y la estabilidad de los compuestos fenólicos (Gertenbach, 2001; Spigno, Tramelli y De Faveri, 2007).

Por otra parte Stan, Soran, Varodi y Lung (2012) encontraron que los compuestos unidos con azúcares tienden a ser los compuestos fenólicos más solubles en agua, por lo que se recomiendan utilizar solventes acuosos en la extracción para aislar y cuantificar la mayor cantidad de glicósidos. En las muestras analizadas en el presente trabajo se encontró que la mayor cantidad de los polifenoles en forma de glicósidos por lo que se considera que en el extracto líquido reúne la mayor cantidad de estos compuestos.

La mayoría de los flavonoides se encuentran naturalmente en la planta como glucósidos, la presencia de azúcares unidos a la estructura flavonoide tiende a que los compuestos fenólicos sean más solubles en agua, por lo que son mejores la combinación de agua, metanol, etanol o acetona (Stan et al., 2012). Esto explica que los glucósidos permanecen en el extracto líquido con cocción y en este estudio el contenido en este extracto fue superior al 80%.

#### 8.4 Identificación de los principales flavonoides en perejil

Los flavonoides presentes en el perejil ha sido analizados y documentados por otros autores, los primeros reportes aparecen desde hace aproximadamente 50 años. Ortmann, Sandermann y Grisebach (1970) y Grisebach y Bilhuber (1967) en *P. sativum* mencionan que los principales glicósidos son apiina y crisoeriol. Posteriormente Justesen, Knuthsen y Leth (1998) encuentran un contenido de apigenina en el perejil de 185 mg/100g. Nielsen (1999) indica que el glicosido apiina es la forma mas común que se presenta en *P. crispum* y más recientemente Kaiser, Carle y Kammerer (2013) señala también en *P. crispum* la presencia de glicósidos de flavonas, principalmente apiina y crisoeriol.

Plazonić et al., (2009) reportan como flavonoide mayoritario en *Caucalis platycarpus* L. (especie de perejil del Mediterráneo) apigenina 5.011 mg/kg, que equivale a 0.005 mg/g. En el presente estudio se obtuvieron en las muestras frescas (control) 0.11 mg/g en *P. sativum* y 0.07 mg/g en *P. crispum* de apigenina cantidades muy superiores a las reportadas en la especie europea.

Los constituyentes de azúcares en el perejil (*Apium petroselinum*) ya han sido analizados anteriormente, Mendicino y Malcolm Picken (1965) realizaron una hidrólisis con ácido clorhídrico al glicosido apigenina-2-Orto-apiosil-glucosido (apiina). Éste glucosido flavonoide tiene un azúcar (apiosa), éste autor encontró que la cantidad de apiosa (antes de hidrólisis) y apigenina después que la muestra fue hidrolizada era la misma, por lo que concluye que toda la apiosa del perejil se produce como glicosido de la flavona apiina. En las especies de perejil estudiadas (*P. sativum* y *P. crispum*) también se encontró que prácticamente toda la apigenina se encontraba en forma de glucosidos ya que sin hidrólisis sólo se encontraban trazas de este compuesto (por encima del límite de detección pero por debajo del límite de cuantificación) y después de la hidrólisis se cuantifican 6.6 y 9.5 mg/g en *P. sativum* y *P. crispum* respectivamente.

Así mismo, Boldizsár, Füzfai y Molnár-Perl (2013) encontraron que la descomposición de glicósidos de apigenina y crisoeriol a sus agliconas se forman proporcionalmente en paralelo. Además al hacer HPLC-UV la muestra sin hidrólisis presentaba un pico con tiempo de retención de 3.59 minutos correspondiente a glicósidos de apigenina unido con crisoeriol. La muestra con hidrólisis no presenta el pico de glicósidos, solo se encuentran las agliconas apigenina y crisoeriol con tiempos de retención 9.55 y 10.0 respectivamente. En el presente estudio las muestras sin hidrólisis presentaron tener el pico correspondiente a glicósidos con tiempo de retención de 4.8 minutos y las muestras con hidrólisis contienen apigenina en 8.38 minutos y se muestra un pico no identificado en 9.9 minutos, que con la anterior información se considera que puede ser crisoeriol, el cual no fue determinado ya que no se contaba con el estándar de ese flavonoide.

## **8.5 Efecto del tratamiento térmico en compuestos fenólicos**

El efecto del tratamiento térmico sobre el contenido de polifenoles ya ha sido previamente investigado, Wong (2006) reportó en extracto líquido en hojas de *P. crispum* de Vancouver, Canadá por agitación a 80 °C durante 4 horas un contenido de polifenoles totales de 89.3 mM expresado como ácido cafeico/100g, que al hacer la conversión representa 16.08 mg/100g. En el presente estudio se reporta que las concentraciones son similares entre los tiempos de tratamiento térmico durante uno hasta 30 minutos, sin que exista diferencia significativa entre los tiempos, sin embargo, es importante aclarar que el contenido de polifenoles sin tratamiento es significativamente ( $p < 0.05$ ) menor con respecto a un minuto de tratamiento.

Así mismo, Kaiser (2012) reporta un aumento no significativo de contenido al someterlo a un minuto y una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) a los 5 minutos de tratamiento por escaldado a 100 °C, en este estudio por inmersión a 100 °C el aumento de contenido con tratamiento (un minuto) es significativo ( $p < 0.05$ ) y la disminución en los tiempos subsecuentes hasta 30 minutos no fue



significativa. Esto puede deberse a diferencias en la metodología ya que dichos autores realizaron un pre tratamiento antes de la determinación de polifenoles con metanol al 50% durante 15 minutos y decantación con acetona al 70%.

El blanqueado a vapor también fue reportado por Kaiser (2012) en *P. crispum* donde, a los 5 minutos de tratamiento térmico a 100 °C el contenido es de 47.4 mmol GAE/kg, lo que representa un 0.81 mg GAE/ 100g. El autor propone que el contenido de polifenoles es más alto en tiempos de calentamientos bajos (1-4 minutos) por la inactivación de polifenol oxidasas en tratamiento a esta temperatura. Cabe señalar que en el presente estudio el contenido de polifenoles totales en la misma especie con tratamiento térmico a vapor durante 5 minutos fue 7.42 veces más que lo reportado en 2012 por Kaiser.

Un factor importante en la cuantificación de los compuestos fenólicos es la temperatura utilizada para la extracción, Popovici, Capcanari, Deseatnicova y Sturza (2011) encontraron que el calentamiento por inmersión a 80 °C de *P. crispum* mostró obtener mayor contenido de polifenoles totales a comparación de temperaturas menores. Por otra parte, Luthria (2008) concluye que la temperatura de extracción que obtuvo mayor contenido de compuestos fenólicos fue de 100 °C y que temperaturas más altas muestran una disminución de contenido quizá por una descomposición de estos compuestos.

Es posible que la temperatura empleada en el presente estudio sea más eficiente para lograr extraer el mayor contenido de polifenoles y/o para una mejor solubilización y por lo tanto encontrarlo en la porción acuosa a 100 °C por tiempos cortos es donde se encuentra el mayor contenido. El contenido de polifenoles totales en nuestra muestra por un minuto contiene 17.64 mg ácido gálico/ 100g en *Petroselinum crispum*.

Es importante señalar que las temperaturas más altas provocan una mayor solubilidad de los compuestos en el disolvente. Entre más alta sea la

temperatura, mayor es el coeficiente de difusión por lo tanto es mayor la tasa de extracción. Pero muchos fitoquímicos son térmicamente inestables por lo que la temperatura de extracción debe ser monitoreada para evitar descomposición térmica. Se debe encontrar un equilibrio entre la temperatura más alta posible de extracción pero sin la destrucción de los compuestos de interés (Gertenbach, 2001).

El tiempo de tratamiento térmico generado por microondas también tiene un efecto benéfico en el contenido de compuestos fenólicos ya que Kamel (2013) reporta un aumento de compuestos fenólicos en *P. crispum* al utilizar microondas por 1 minuto a 750 W respecto a la muestra fresca sin tratamiento, también reporta un descenso subsecuente al calentamiento durante 2 y 3 minutos con las mismas condiciones y de igual forma una disminución de 12.73% al ser secado por microondas.

En la literatura existen pocos reportes específicos sobre el flavonoide apigenina y el efecto de la temperatura sobre este, hace un poco más de una década Justesen y Knuthsen (2001) las muestras de perejil *Petroselinum crispum* fueron hervidas por 4 horas en solución ácida agua-metanol obteniendo apigenina 510-630 mg/100g, lo que coincide con el contenido de apigenina en el presente estudio con tiempos de 15 y 30 minutos de tratamiento (609 y 529 mg/100g respectivamente).

En un estudio realizado por Luthria (2008) se observó diferencia de los glicósidos presentes utilizando temperaturas de extracción diferentes, la temperatura de extracción que obtuvo mayor contenidos de compuestos fenólicos fue de 100 °C la cantidad de apiina y acetil-apiina aumenta, mientras que malonil-apiina disminuye, en contraste con temperaturas más bajas indicando que la malonilapiina es inestable a altas temperaturas y se convierte a acetil-apiina y a apiina por medio de descarboxilación y desacetilación.

Kaiser, Carle y Kammerer (2013) reportan que la apiina en muestras con tratamiento térmico a vapor durante un minuto a 100 °C resultó ser más alto que los subsecuentes tiempos (5, 7 y 10 minutos). El blanqueado en agua por un minuto disminuye 83.33% de contenido de apiina respecto al tratamiento a vapor por un minuto. En el presente estudio el tratamiento térmico por inmersión en agua a 100° C por un minuto en las 2 especies muestra mayor contenido de apigenina.

## **8.6 Efecto de la senescencia en el contenido de compuestos fenólicos**

La senescencia de productos vegetales (frutas y hortalizas) está ligada a complejas modificaciones físicas y químicas. Entre los fenómenos más destacados están el ablandamiento, modificaciones en coloración, aroma y sabor.

Este proceso (senescencia) se caracteriza por cambios en la intensidad respiratoria (principalmente en productos climatéricos), en las vías metabólicas, cambios en la composición química en la mayoría de los compuestos (hidratos de carbono, proteínas, enzimas, ácidos, pigmentos y compuestos aromáticos) (Belitz, 1997).

Se debe tener en cuenta que los diferentes compuestos fenólicos en las frutas y vegetales son el sustrato en las reacciones de pardeamiento enzimático (por polifenoloxidasas) y en reacciones de obscurecimiento por unión con iones metálicos como cobre y hierro. Estas reacciones son muy importantes en vegetales con lesiones o magulladuras ya que en esos casos se activan las enzimas polifenoloxidasas dando como resultados el pardeamiento enzimático en las lesiones de las frutas o vegetales. Cambios similares en los compuestos fenólicos se pueden presentar durante la senescencia de los productos, lo que pueden favorecer el pardeamiento de determinados tejidos (Fennema, 2010).

En el presente estudio se encontró que los polifenoles y los flavonoides del *P. sativum* disminuyen (aunque no significativamente) cuando el producto se encuentra en estado de senescencia en comparación de los productos en estado fresco. Es interesante observar la variación en el contenido de polifenoles entre las muestras analizadas en estado de senescencia, lo que hace pensar que depende del grado de tejido dañado en el producto dando como resultado la degradación de los compuestos fenólicos por las polifenoloxidasas que se activan en estas circunstancias.

Es importante señalar la diferencia entre las especies ya que en *P. crispum* en senescencia no se presenta una disminución en el contenido de polifenoles totales y en contraste se presenta un ligero incremento aunque no significativo en el contenido de flavonoides, quizá porque en esta especie de perejil el grado de pardeamiento es considerablemente menor que en *P. sativum*.

Todo lo anterior sugiere que las dos especies de perejil consumidas en la región contienen cantidades similares de compuestos fenólicos antioxidantes en estado fresco, pero difieren con lo reportado en productos cultivados en diferentes regiones del mundo. Los tratamientos térmicos administrados incrementan significativamente ( $p < 0.05$ ) el contenido de los compuestos fenólicos en forma diferente entre las especies, así mismo, la duración del tratamiento térmico influye en el contenido de estos compuestos.

En resumen en el presente trabajo se encontró que los tratamientos térmicos como inmersión (agua destilada a 100 °C) y cocción a vapor modifican el contenido de compuestos fenólicos en las dos especies de perejil *P. crispum* y *P. sativum* observando resultados consistentes en los análisis de polifenoles totales, flavonoides totales y concentración de apigenina, con lo que se acepta la hipótesis planteada.

Es necesario continuar con más investigación a fin de encontrar el tratamiento térmico adecuado para incrementar el contenido de estos compuestos bioactivos sin producir daño en otros nutrimentos, así como evaluar si la capacidad antioxidante guarda una relación directa con este incremento encontrado.

También será interesante conocer si este fenómeno es similar en otras especies vegetales y así evaluar los tratamientos tecnológicos desde un nuevo punto de vista, ya que por una parte destruyen nutrimentos como las vitaminas pero por otro lado incrementan el contenido de flavonoides antioxidantes.

## 9 CONCLUSIONES

1. El contenido de polifenoles totales entre las especies de perejil *P. crispum* y *P. sativum* fresco es similar.
2. El contenido de polifenoles en *P. crispum* es mayor a lo reportado en la literatura mientras que para *P. sativum* se encontró menor contenido.
3. El contenido de flavonoides totales difiere significativamente ( $p < 0.05$ ) entre las especies estudiadas en estado fresco.
4. El tiempo de tratamiento térmico produce incrementos significativos ( $p < 0.05$ ) en el contenido de polifenoles y flavonoides en el extracto líquido en las dos especies estudiadas.
5. El mayor contenido de compuestos fenólicos se solubilizan y se encuentran en el extracto líquido como glicósidos.
6. El compuesto fenólico mayoritario corresponde al glicósido apiina, que al ser hidrolizada la muestra se convierte a su aglicona apigenina.
7. Existen cantidades pequeñas de otros flavonoides en las muestras frescas sin hidrólisis, como kaempferol y ácido clorogénico, este último al hidrolizar la muestra se descompone a ácido cafeico y ácido quínico.
8. El tratamiento térmico por cortos tiempos incrementa de manera significativa ( $p < 0.05$ ) el contenido de polifenoles y flavonoides totales.
9. Los tratamientos térmicos prolongados (15 a 30 minutos) ocasionan una reducción en el contenido de polifenoles y flavonoides.
10. Es más eficiente en tratamiento térmico por inmersión en agua a 100 °C, que utilizando vapor de agua debido a la distribución uniforme y constante del calor.

## 10 LITERATURA CITADA

1. Aheme, S. A. y O'Brien, N. M. (2002). Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 75-81.
2. Akpinar, K. E., Bicer y. y Cetinkaya, F. (2006). Modelling of thin layer drying of parsley leaves in a convective dryer and under open sun. *Journal of Food Engineering*, 308-315.
3. Al-Howiriny, T., Al-Sohaibani, M., Al-Said, M., Al-Yahya, M., El-Tahir, K. y Rafatullah, S. (2005). Effect of *Commiphora opobalsamum* (L.) Engl. (Balessan) on experimental gastric ulcers and secretion in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 287-294.
4. Al-Howiriny, T., Al-Sohaibani, M., El-Tahir, K. y Rafatullah, S. (2003). Prevention of experimentally-induced gastric ulcers in rats by an ethanolic extract of "Parsley" *Petroselinum crispum*. *The American Journal of Chinese Medicine*, 699-711.
5. Alireza y., Daneshmandi, S., Soleimani, N., Bagheri, K. y Mohammad, H. K. (2012). Immunomodulatory effect of Parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil on immune cells: Mitogenactivated splenocytes and peritoneal macrophages. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 303-308.
6. Al-Juhaimi, F. y Ghafoor, K. (2011). Total phenols and antioxidant activities of leaf and stem extracts from coriander, mint and parsley grown in Saudi Arabi. *Pakistan Journal of Botany*, 2235-2237.
7. Anand, N. K., Sharma, N. D. y Gupta, S. R. (1981). Coumarins from *Apiumn petroselinum* seeds. *National Academy Science Letters*, 249-251.
8. AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. *Association of Official Analytical Chemists* (15 ed.). Seccion 14.003. Washington, DC, USA: AOAC.
9. AOAC. (2000). Official Methods of Analysis. *Association of Official Analytical Chemists* (16 ed.). Seccion 952.03. Gaithersburg, MD, USA: AOAC
10. Arango, D., Morohashi, K. yilmaz, A., Kuramochi, K., Parihar, A., Brahimaj, B., . . . Doseff, A. I. (2013). Molecular basis for the action of a dietary flavonoid revealed by the comprehensive identification of apigenin human targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, E2153–E2162.

11. Belitz, H. D. y Grosch, W. (1997). *Química de los Alimentos*. Zaragoza, España: Acribia S. A.
12. Boersma, M. G., van der Woude, H., Bogaards, J., Boeren, S., Vervoort, J., Cnubben, N. H., . . . Rietjens, I. M. (2002). Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. *Chemical Research in Toxicology* , 662– 670.
13. Boldizsár, I., Füzfai, Z. y Molnár-Perl, I. (2013). Characterization of the endogenous enzymatic hydrolyses of *Petroselinum crispum* glycosides: determined by chromatography upon their sugar and flavonoid products. *Journal of Chromatography A*, 100-106.
14. Bursac, M., Popovic, M., Mitic, R., Kaurinovic, B. y Jako, V. (2005). Effects of parsley (*Petroselinum crispum*) and celery (*Apium graveolens*) extracts on induction and sleeping time in mice. *Pharmaceutical Biology*, 780-783.
15. Burton, J. M. (01 de Agosto de 2002). *Online Guide to Umbelliferae of the British Isles*. Recuperado el 03 de Julio de 2013, de Spookspring`s Resources: <http://www.spookspring.com/Umbels/index.html>
16. Cao, J., Zhang y., Chen, W. y Zhao, X. (2010). The relationship between fasting plasma concentrations of selected flavonoids and their ordinary dietary intake . *British Journal of Nutrition* , 249– 255.
17. Cartaya, O. y Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 5-11.
18. Chaves, D. S., Frattani, F. S., Assafim, M., de Almeida, A. P., de Zingali, R. B. y Costa, S. S. (2011). Phenolic chemical composition of *Petroselinum crispum* extract and its effect on haemostasis. *Natural Product Communications*.
19. Cirilo Aguilar, B. G. (2003). Determinación bioquímica, reductora ponderal y supresora de apetito de *Smilax moranensis* Martens y *Galeotti* y *Centaurium quitense* (Kunth) B. L. Robinson. (Tesis inédita de doctorado). Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N. L.
20. Cun, R. G., Leon, M. F. y Garcia, S. H. (2007). Respuesta del apio ( *Apium Graveolens* l) y perejil (*Petroselinum Crispum*, mill), a diferentes coeficientes



- de cultivo en condiciones de organopónicos. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 1-5.
21. Darías, V., Martín-Herrera, D. y Abdala, S. (2001). Plants used in urinary pathologies in the Canary islands. *Pharmaceutical Biology*, 170.
  22. Davey, M. W., Bauw, G. y Montagu, M. V. (1996). Analysis of ascorbate in plant tissue by high performance capillary zone electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 8-19.
  23. de Pascual-Teresa, S., Rivas-Gonzalo, J. C. y Santos-Buelga, C. (2000). Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5331-7.
  24. Domínguez X. (1988). Métodos de Investigación Fitoquímica. Limusa. México.
  25. Engelmann, C., Blot, E., Panis y., Bauer, S., Trochon, V., Nagy, H. J., . . . Soria, C. (2002). Apigenin – strong cytostatic and anti-angiogenic action in vitro contrasted by lack of efficacy in vivo . *International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* , 489-495.
  26. Fatemeh, H., Seid, A. K., Majid, M. S., Soltan-Ali, M. y Mohammad-Reza, R. (2011). Effects of parsley (*Petroselinum crispum*) and its flavonol constituents, kaempferol and quercetin, on serum uric acid levels, biomarkers of oxidative stress and liver xanthine oxidoreductase activity in oxonate-induced hyperuricemic rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 811-819.
  27. Fejes, S., Blazovics, A., Lemberkovics, E., Petri, G., Szoke, E. y Kery, A. (2000). Free radical scavenging and membrane protective effects of methanol extracted fractions of parsley. *Acta-Alimentaria*, 81-87.
  28. Fejes, S., Kéry, A., Blàzovics, A., Lugasi, A., Lemberkovics, E., Petri, G. y Szôke, E. (1998). Investigation of the *in vitro* antioxidant effect of *Petroselinum crispum* (Mill.) Nym. ex A. W. Hill. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 150-6.
  29. Fennema Owen R. (2010). *Introducción a la ciencia de los alimentos*. Barcelona, España: Acribia S. A.

30. Fonnegra, G. R. y Jimenez R., S. L. (2007). Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Medellín, Colombia.: Universidad de Antioquia.
31. Gadi, D., Bnouham, M., Aziz, M., Ziyat, A., Legssyer, A., Legrand, C., . . . Mekhfi, H. (2009). Parsley extract inhibits *in vitro* and *ex vivo* platelet aggregation and prolongs bleeding time in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 170-174.
32. García, M., Rugel, J., Rodríguez, E. y Vargas, É. M. (2010). Aprovechamiento de cilantro (*Coriandrum sativum*) y perejil (*Petroselinum crispum*) aplicando procesos combinados de deshidratación. *Resultados de Investigacion*, 16-19.
33. Gebhardt y., Witte, S., Forkmann, G., Lukacin, R., Matern, U. y Martens, S. (2005). Molecular evolution of flavonoid dioxygenases in the family Apiaceae. *Phytochemistry*, 1273-1284.
34. Gertenbach, D. D. (2001). Solid-liquid extraction technologies for manufacturing nutraceuticals from botanicals. En J. Shi, G. Mazza y M. L. Maguer, *Functional foods biochemical and processing aspects* (Vol. 2, págs. 331-366). Boca Ratón, Florida: CRC Press.
35. Grisebach, H. y Bilhuber, W. (1997). Zur Biosynthese des Apigenins und Chrysoerols in der Petersilie. *Journal of Chemical Sciences*, 746-751.
36. Grüner, H., Reinhold, M. y Gil, A. (2008). *Procesos de Cocina*. (A. González, Trad.) Madrid, España, Europa: Editorial Akal, S.A.
37. Guija., E., Luzmila., T., Javier., E., Felio., P., Marco., N., Gisela., O. y Alejandro., F. (2011). Efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de *Petroselinum sativum* (perejil) sobre la expresión de Cox-2 y activación del Nf-B hepáticos, generados por la administración de sulfato ferroso y vitamina C en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina*, S22.
38. Haidari, F., Keshavarz, S. A., Shahi, M. M., Mahboob, S.-A. y Rashidi, M.-R. (2011). Effects of parsley (*Petroselinum crispum*) and its flavonol constituents, kaempferol and quercetin, on serum uric acid levels, biomarkers of oxidative stress and liver xanthine oxidoreductase activity in oxonate-

- induced hyperuricemic rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* , 811-819.
39. Halliwell, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communication*, 1-32.
  40. Hempel, J. y Bohm, H. (1996). Quality and quantity of prevailing flavonoid glycosides of yellow and green french beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 2114-2116.
  41. Hochmuth, G. J., Stanstly, P. A., Kucharek, T. A., Stall, W. M., Vavrina, C. S. y Maynard, D. N. (Febrero de 1999). Parsley Production in Florida.
  42. Hostetler, G., Riedl, K. y Schwartz, S. (31 de Marzo de 2009). *Effects of Juice Processing on Anti-inflammatory Flavonoids in Plant Food*. Obtenido de The Ohio State University, University Libraries: <http://hdl.handle.net/1811/36566>
  43. Huijuan, J., Huifeng, R., Chuanzong, D., Hisanori, K. y Hideaki, E. (2012). Effects of chinese parsley (*Coriandrum sativum*) on oxidative stabilities of diet during storage as compared with a synthetic antioxidant. *International Journal of Food*, 1394-1407.
  44. Infoagro Systems, S. (1997). *infoAgro.com*. Recuperado el 19 de Diciembre de 2012, de infoAgro.com: <http://www.infoagro.com/aromaticas/perejil.htm>
  45. Janssen, K., Mensink, R. P., Cox, F. J., Harryvan, J. L., Hovenier, R., Hollman, P. C. y Katan, M. B. (1998). Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an *in vitro* and a dietary supplement study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 255-262.
  46. Jeong y.-J., Choi y.-J., Choi, J.-S., Kwon, H.-M., Kang, S.-W., Bae, J.-Y., . . . Kang y.-H. (2007). Attenuation of monocyte adhesion and oxidised LDL uptake in luteolin-treated human endothelial cells exposed to oxidised LDL. *British Journal Nutrition*, 447-457.
  47. Justesen, U. y Knuthsen, P. (2001). Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry*, 245-250.

48. Justesen, U., Knuthsen, P. y Leth, T. (1998). Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 101-110.
49. Kaiser, A., Brinkmann, M., Carle, R. y Kammerer, D. R. (2012). Influence of thermal treatment on color, enzyme activities, and antioxidant capacity of innovative pastelike parsley products. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 3291-3301.
50. Kaiser, A., Carle, R. y Kammerer, D. R. (2013). Effects of blanching on polyphenol stability of innovative paste-like parsley (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym ex A. W. Hill) and marjoram (*Origanum majorana* L.) products. *Food Chemistry*, 1648–1656.
51. Kamel, S. M. (2013). Effect of microwave treatments on some bioactive compounds of parsley (*Petroselinum Crispum*) and dill (*Anethum graveolens*) leaves. *Journal of Food Process y Technology*, 1-5.
52. Kao, T. H., Huang, S. C., Inhbaraj, S. B. y Chen, B. H. (2008). Determination of flavonoids and saponins in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino by liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 200-211.
53. Kinoshita, T., Lepp, Z., Kawai y. y Terao, J. C. (2006). An integrated database of flavonoids. *Biofactors*, 179-88.
54. Kostennikova ZA. (1983). UV spectrophotometric quantitative determination of flavonoid in calendula tincture. *Farmatsiya*; 33(6):83-6
55. Kreydiyyeh, S. y Usta, J. (2002). Diuretic effect and mechanism of action of parsley. *Journal Ethnopharmacology*, 353-357.
56. Kumar, S. y Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal*, 1-16.
57. Layla, H. A., Kahtan, A. A.-M. y Shalal, M. H. (2012). The promising anticancer efficacy of parsley seeds flavonoid (Apigenin). *Journal of Physiological and Biomedical Sciences*, 5-12.
58. Leahu, A., Damian, C., Oroian, M., Miculescu, V. y Ropciuc, S. (2013). Variation in content of antioxidant and free radical scavenging activity of basil

- (*Ócimum basilicum*), dill (*Anethum graveolens*) and parsley (*Petroselinum sativum*) . *Journal of Faculty of Food Engineering*, 347 - 353.
59. Leyla y., Kevser, S. B., Esma, T. y Reşat, A. (2008). Combined HPLC-CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay of parsley, celery leaves, and nettle. *Talanta*, 304-313.
  60. López , A. A. y Ortega , A. S. (2014). *Caracterización de semilla de chía (Salvia hispánica L.): Cuantificación parcial de compuestos fenólicos y capacidad de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I in vitro*. (Tesis inedita de licenciatura). UANL. Monterrey, Nuevo Leon.
  61. Lotito, S. B., Zhang, W. J., Yang, C. S., Crozier, A. y Frei, B. (2011). Metabolic conversion of dietary flavonoids alters. *Free Radical Biology and Medicine*, 454-463.
  62. Luthria, D. L. (2008). Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food Chemistry*, 745-752.
  63. Luthria, D. L., Mukhopadhyay, S. y Kwansa, A. L. (2006). A systematic approach for extraction of phenolic compounds using parsley (*Petroselinum crispum*) flakes as a model substrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1350-1358.
  64. Mahmood, S., Hussain, S. y Malik, F. (2014). Critique of medicinal conspicuousness of Parsley (*Petroselinum crispum*): A culinary herb of Mediterranean region . *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 193-202.
  65. Mak, P., Leung y.-K., Tang, W.-Y., Harwood, C. y Ho, S.-M. (2006). Apigenin suppresses cancer cell growth through ER $\beta$  Neoplasia. *Neoplasia an International Journal for Oncology*, 896-904.
  66. Manthey, J. A. y Guthrie, N. (2002). Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5837-5843.

67. Marczał, G., Balogh, M. y Verzar-Petri, G. (1997). Phenol- ether components of diuretic effect in Parsley I. *Acta Agronomica Academia Scientiarum Hungaricae*, 7-13.
68. Marinova, D., Ribarova, F. y Atanassova, M. (2005). Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 255-260.
69. Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M. y Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*, 271-278.
70. Massey, L. K., Liebman, M. y Kynast-Gales, S. A. (2005). Ascorbate increases human oxaluria and kidney stone risk. *Journal of Nutrition*, 1673-1677.
71. Méndez, G. (1996). *Estudio farmacognóstico y fitoquímico preliminar de Cymbopogon citratus (DC) stapf y sus extractos*. (Tesis inédita de Maestría). IFAL. Ciudad de La Habana, Cuba. p. 36-8.
72. Mendicino, J. y Malcolm Picken, J. (1965). The Biosynthesis of the Branched Chain Sugar D-Apiose in Lemma and Parsley. *The Journal of Biological Chemistry*, 2797-2805.
73. Mercado-Mercado, G., de La Rosa Carillo, L. y Wall-Medrano, A. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutricion Hospitalaria*, 36-46.
74. Meyer, H., Bolarinwa, A., Wolfram, G. y Linseisen, J. (2006). Bioavailability of apigenin from apiin-rich parsley in humans. *Annals of Nutrition and Metabolism Journal*, 167– 172.
75. Mišan, A. Č. (2009). Antioxidant properties of food supplemented with medicinal plants. *Journal of the Institute for Food Technologists in Novi Sad*, 81-85.
76. Moazedi, A. A., Mirzaie, D. N., Seyyednejad, S. M., Zadkarami, M. R. y Amirzargar, A. (2007). Spasmolytic effect of *Petroselinum crispum* (parsley) on rat's ileum at different calcium chloride concentrations. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4036-4042.

77. Mobile, L., Bruckdorfer, K. R. y Rice-Evans, C. (1999). Moderate supplementation with natural alpha- tocopherol decreases platelet aggregation and low- density lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis*, 177-185.
78. Mohammad, B. H. (2010). GC/EI-MS investigation of cultivated *Petroselinum hortense* Hoffm. fruit volatile oil from Northwest Iran. *Chemija*, 123-126.
79. Munguia, R. A., Cuevas, Z. D. y Martinez, A. A. (2012). *Perejil (Petroselinum crispum): compuestos químicos y aplicaciones*. Recuperado el 19 de Diciembre de 2012, de eumed.net: <http://www.eumed.net/rev/tlatemoani/11/perejil-compuestos-químicos-aplicaciones.html>
80. Németh, K., Plumb, G. W., Berrin, J.-G., Juge, N., Jacob, R., Naim, H. Y., . . . Kroon, P. A. (2003). Deglycosylation by small intestinal epithelial cell  $\beta$ -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *European Journal of Nutrition*, 29– 42.
81. Newall, C., Anderson, L. y Phillipson, J. (1996). *Herbal Medicine: A Guide for Health-Care Professionals*. London: Pharmaceutical Press.
82. Nicholas, C., Batra, S., Vargo, M. A., Voss, O. H., Gavrilin, M. A., Wewers, M. D., . . . Doseff, A. I. (2007). Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF- $\kappa$ B through the suppression of p65 phosphorylation. *Journal of Immunology*, 7121– 7127.
83. Nielsen, S. E. young, J. F., Daneshvar, B., Lauridsen, S. T., Knuthsen, P. y Sandstrom, B. (1999). Effect of parsley intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 447-455.
84. Oršolić, N., Bevanda, M., Kujundžić, N., Plazonic, A., Stajcar, D. y Kujundžić, M. (2010). Prevention of peritoneal carcinomatosis in mice by combining hyperthermal intraperitoneal chemotherapy with the water extract from burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.). *Planta Medica*, 773-779.

85. Ortega, R. M., Basabe, B. y Lòpez, A. M. (2006). Frutas, hortalizas y verduras. En J. Aranceta, L. Serra, R. Ortega y C. Pérez, *Frutas, Verduras y Salud* (págs. 1-18). Barcelona, España: Elsevier-Masson.
86. Ortmann, R., Sandermann, H. y Grisebach, H. (1970). Transfer of apiose from udp-apiose to 7-O-(B-D-glycosyl)-apigenin and 7-O-(B-D-glycosyl)-chrysoeriol with an enzyme preparation from parsley. *North-Holland Publishing Company - Amsterdam* , 164-166.
87. Pace-Asciak, C. R., Hahn, S., Diamandis, E. P., Soleas, G. y Goldberg, D. M. (1995). The red wine phenolics trans- resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clinica Chimica Acta*, 207-219.
88. Pearson, D. A., Paglieroni, T. G., Rein, D., Wun, T., Schramm, D. D., Wang, J. F., . . . Keen, C. L. (2002). The effect of flavonol-rich cocoa and aspirin on ex vivo platelet function. *Thrombosis Research*, 191-197.
89. Peterson, S., Lampe, J. W., Bammler, T. K., Gross-Steinmeyer, K. y Eaton, D. L. (2006). Constituyentes vegetales Apiaceous inhiben el citocromo P-450 humano 1A2 actividad (hCYP1A2) y mutagenicidad hCYP1A2 mediada de aflatoxina B 1. *Food and Chemical Toxicology*, 1474-1484.
90. Piantelli, M., Rossi, C., Iezzi, M., La Sorda, R., Iacobelli, S., Alberti, S. y Natali, P. G. (2006). Flavonoids inhibit melanoma lung metastasis by impairing tumor cells endothelium interactions. *Journal of Cellular Physiology*, 23– 29.
91. Plazonić, A., Bucar, F., Željanić, M., Mornar, A., Nicović, B. y Kujundžić, N. (2009). Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules*, 2466-2490.
92. Popovici, C., Capcanari, T., Deseatnicova, O. y Sturza, R. (2011). Does application of *Petroselinum crispum* and *Levisticum officinale* Koch. extracts improve the thermal stability of vegetable oils?. *Papers of the Sibiu Alma Mater University Conference*, 24-26.



93. Priecina, L. y Karlina, D. (2013). Total polyphenol, flavonoid content and antiradical activity of celery, dill, parsley, onion and garlic dried in conventive and microwave-vacuum dryer. *2nd International Conference on Nutrition and Food Science*, 107-112.
94. Quiñones., M., Miguel., M. y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables. *Nutricion Hospitalaria*, 76-89.
95. Rein, D., Paglieroni, T. G., Pearson, D. A., Wun, T., Schmitz, H. H., Gosselin, R. y Keen, C. L. (2000). Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. *Nutrition*, 2120-2126.
96. Reyes Ruíz, S. G., Venegas Casanova, E. A., Chávez Gaona, M. H. y Eustaquio Saldarriaga, C. L. (2010). Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. “noni” y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales. *UCV - Scientia*, 11-22.
97. Rezazad, M. y Farokhi, F. (2014). Protective effect of *Petroselinum crispum* extract in abortion using prostadin- induced renal dysfunction in female rats . *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 312-319.
98. Rietjens, I. M., Boersma, M. G., Haan, L., Spenkelink, B., Awad, H. M., Cnubben, N. H., . . . Koeman, J. H. (2002). The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Enviromental Toxicology and Pharmacology*, 321-333.
99. Rivas-Gonzalo, J. C. y Garcia-Alonso, M. (2002). Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. *Alimentacion, Nutricion y Salud*, 31-38.
100. Sakakibara, H., Honda y., Nakagawa, S., Ashida, H. y Kanazawa, K. (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 571-581.
101. Scalbert, A. y Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 2073S-2085S.

102. Setchell, K. D., Brown, N. M. y Lydeking Olsen, E. (2002). The clinical importance of the metabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *Journal of Nutrition*, 3577-3584.
103. Shi, J., Mazza, G. y Le Maguer, M. (2002). *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects, Volume 2* . Estados Unidos de America: CRC Press.
104. Shu, P., Hong, J.-L., Wu, G. yu, B.-Y. y Quin, M.-J. (2010). Analysis of flavonoids and phenolic acids in *Iris tectorum* by HPLC-DAD-ESI-MS. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 0202-0207.
105. Simon, J. E., Rabin, J. y Clavio, L. (3 de julio de 2013). Parsley: A production guide. West Lafayette, Indiana. Obtenido de <http://www.spookspring.com/Umbels/index.html>
106. Simon, J., Chadwick, A. y Craker, L. (1984). Herbs: an indexed bibliography, 1971-1980. The scientific literature on selected herbs and medicinal plants of the temperate zone. Hamden, Connecticut: Archon Books.
107. Spigno, G., Tramelli, I. y De Faveri, M. D. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 200-208.
108. Stan, M., Soran, M. L., Varodi, C. y Lung, I. (2012). Extraction And Identification Of Flavonoids From Parsley Extracts By HPLC Analysis. *Processes in Isotopes and Molecules (PIM 2011)* (págs. 50-52). Cluj-Napoca, Rumania: American Institute of Physics.
109. Stankevičius, M., Akuņeca, I., Jākobsone, I. y Maruška, A. (2010). Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activities of spice plants extracts. *Maisto Chemija ir Technologija*, 85-91.
110. Stein Maizo, M. R. (Septiembre de 2014). Trabajo de Investigacion: Umbelíferas. Perejil, cilantro y perifollo. Caracas, República Bolivariana de Venezuela, America del Sur.
111. Taga, M., Miller, E. y Pratt, D. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 928-931.

112. Tian, J., Ban, X., Zeng, H., Huang, B., He, J. y Wang y. (2011). *In vitro* and *in vivo* activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. *Food Control*, 1992-1999.
113. Tian, X. J. yang, X. W. yang, X. y Wang, K. (2009). Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer models. *International Journal of Pharmaceutic*, 58– 64.
114. Trifunski, S. y Ardelean, D. (2012). Quantification of phenolics and flavonoids from *Petroselinum crispum* extracts. *Arad Medical Journal*, 83-86 .
115. Troncoso, L. y Guija, E. (2007). Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum savitum* (perejil) en rata, con intoxicación hepática inducida por paracetamol. *Anales de la Facultad de Medicina*, 333-343.
116. Tyler, V. (1994). *Herbs of Choice*. New York: Pharmaceutical Product Press.
117. Ueda, H. yamazaki, C. y Yamazaki, M. (2004). Hydroxyl group of flavonoids affects oral anti-inflammatory activity and inhibition of systemic tumor necrosis factor- $\alpha$  production. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 119– 125.
118. USDA y NRCS. (2013). *The PLANTS Database*. Recuperado el 27 de Junio de 2013, de National Plant Data Team: <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=PECR2>
119. Vargo, M. A., Voss, O. H., Poustka, F., Cardounel, A. J., Grotewold, E. y Doseff, A. I. (2006). Apigenin-induced-apoptosis is mediated by the activation of PKC $\delta$  and caspases in leukemia cells. *Biochemical Pharmacology*, 681– 692.
120. Walle, T., Ta, N., Kawamori, T., Wen, X., Tsuji, P. A. y Walle, U. K. (2007). Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids – methylated versus unmethylated flavones. *Biochemical Pharmacology*, 1288– 1296.
121. Wan, C. yu y., Zhou, S., Liu, W., Tian, S. y Cao, S. (Enero-Marzo de 2011). Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of *Gynura*

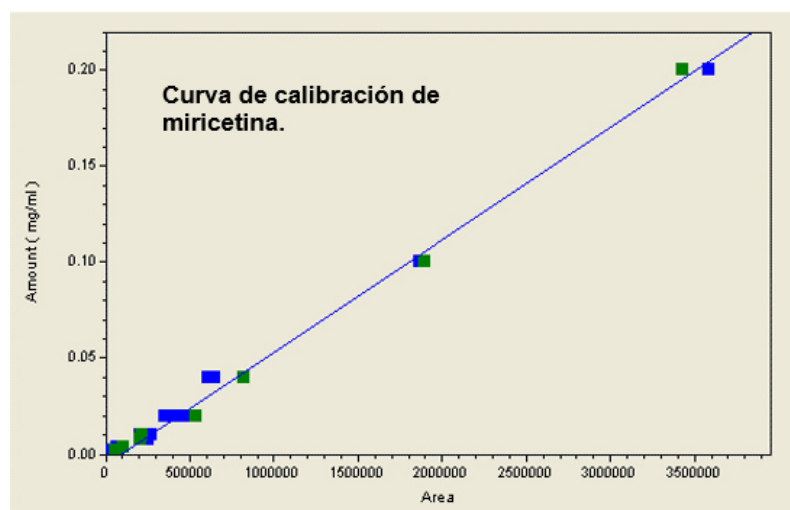
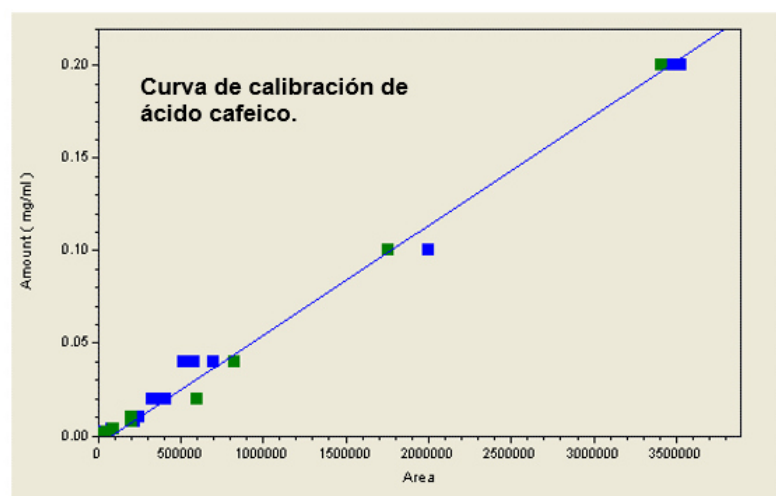
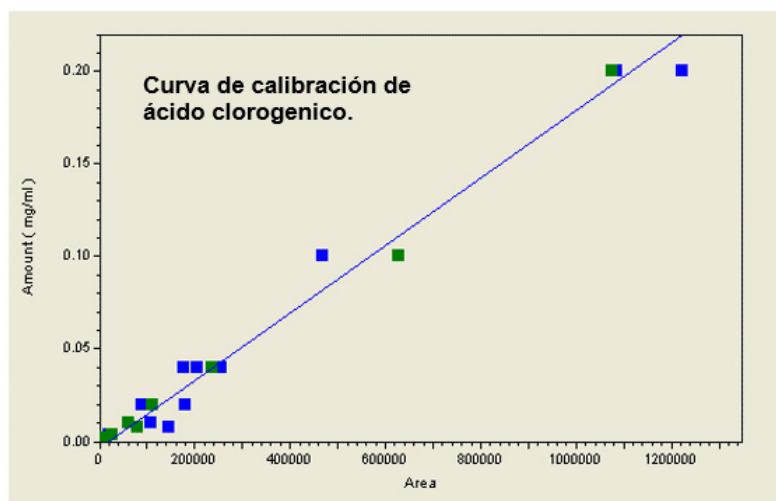
- divaricata* leaf extracts at different temperatures. *Pharmacognosy Magazine* (25), 40-45.
122. Wittemer, S. M., Ploch, M., Windeck, T., Müller, S. C., Drewelow, B., Derendorf, H. y Veit, M. (2005). Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of artichoke leaf extracts in humans. *International Journal of Phytomedicine* , 28-38.
  123. Wong, P. Y. y Kitts, D. D. (2006). Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chemistry*, 505-515.
  124. Yao, L. H., Jiang y. M., Shi, J., Tomás-Barberán, F. A., Datta, N., Singanusong, R. y Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 113-122.
  125. Zeraik, M. L. y Yariwake, J. H. (2010). Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. *Microchemical Journal*, 86–91.
  126. Zhang, H., Chen, F., Wang, X. y Yao, H.-Y. (2006). Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. *Food Research International*, 833-839.
  127. Zhang, T.-T., Zhou, J.-S. y Wang, Q. (2010). HPLC Analysis of flavonoids from the aerial parts of bupleurum species. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 0107-0113.
  128. Zheng, G.-q., Kenney, P. M. y Lam, L. K. (1992). Myristicin: a potential cancer chemopreventive agent from parsley leaf oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 107-110.

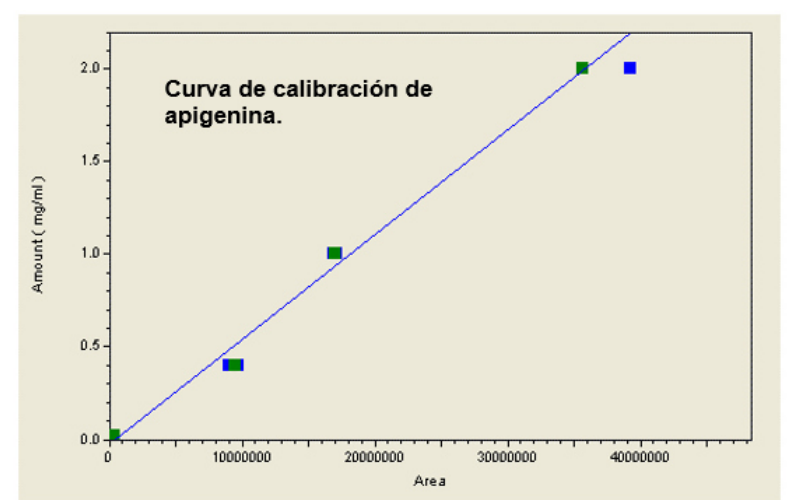
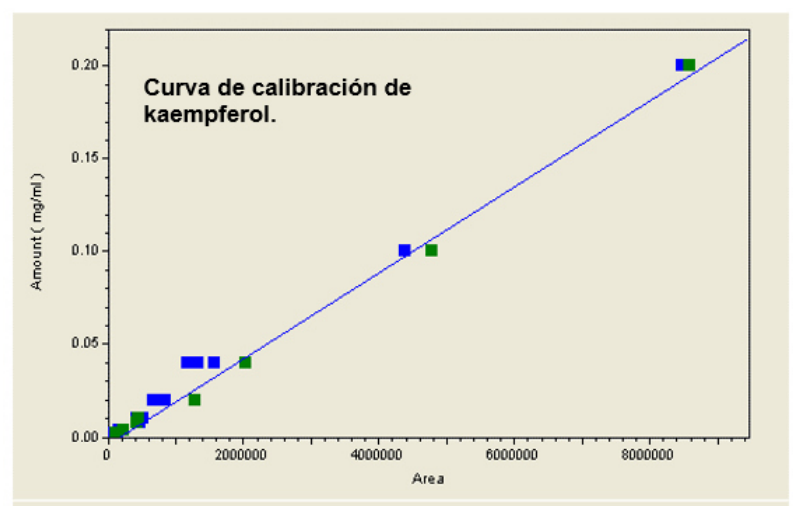
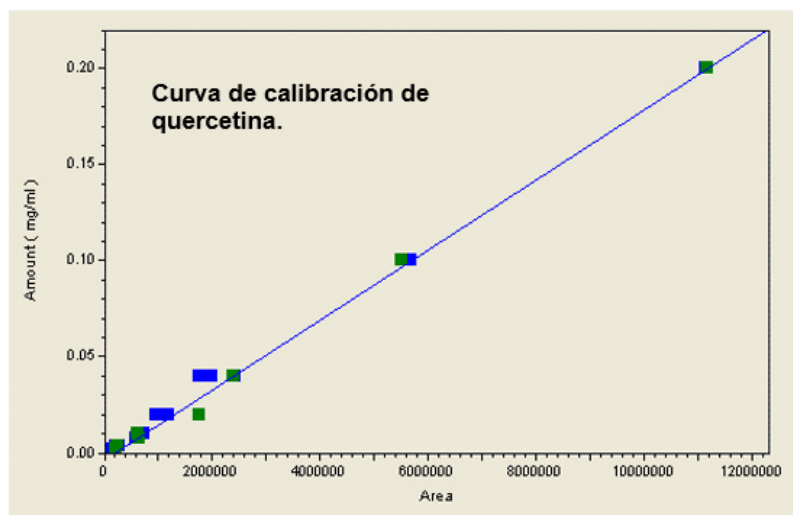
# **11 ANEXOS**

A. Curvas de calibración.

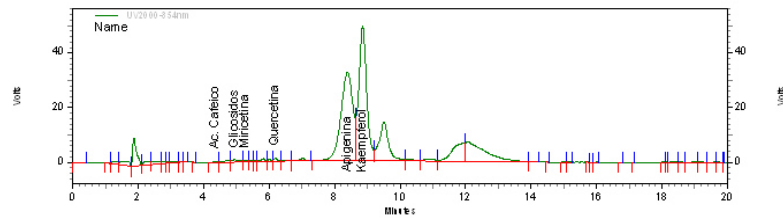
B. Cromatogramas de los diferentes tratamientos.

## Anexo A. Curvas de calibración.

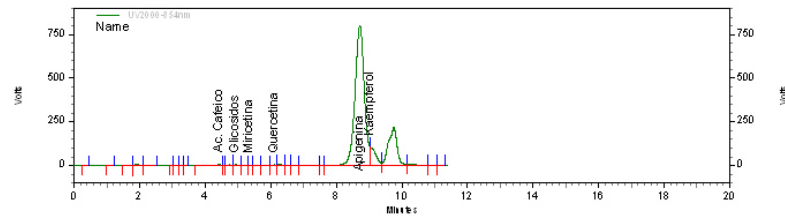




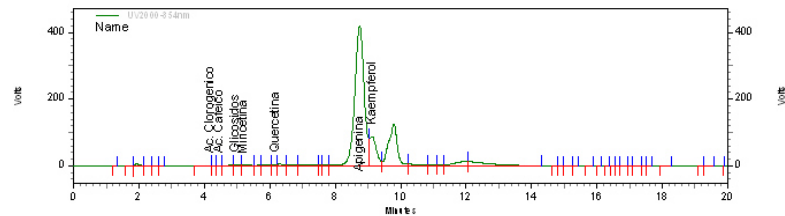
## Anexo B. Cromatogramas de los diferentes tratamientos.



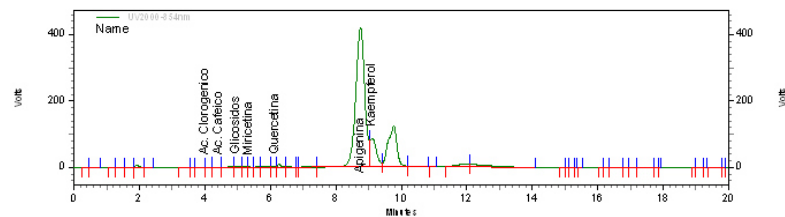
Cromatograma de *P. crispum* fresco (control).



Cromatograma de *P. crispum* tratamiento térmico por inmersión durante 1 minuto.

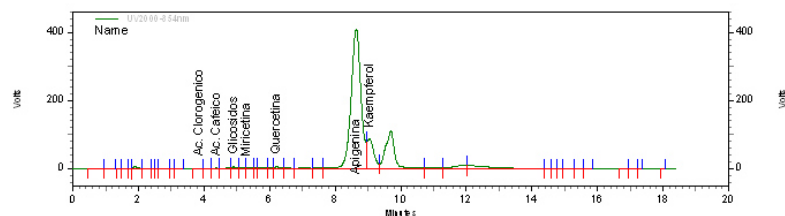


Cromatograma de *P. crispum* tratamiento térmico por inmersión durante 5 minutos.

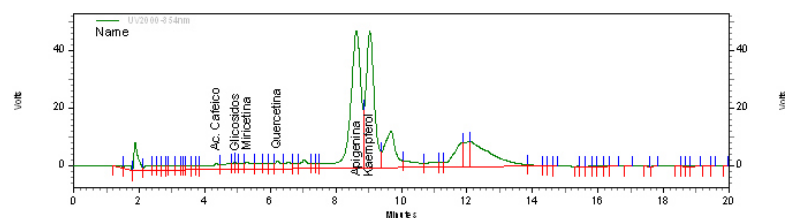


Cromatograma de *P. crispum* tratamiento térmico por inmersión durante 15 minutos.

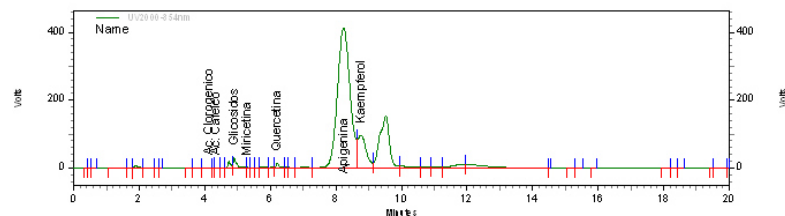




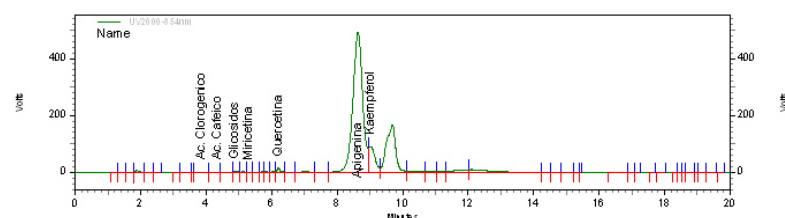
**Cromatograma de *P. crispum* tratamiento térmico por inmersión durante 30 minuto.**



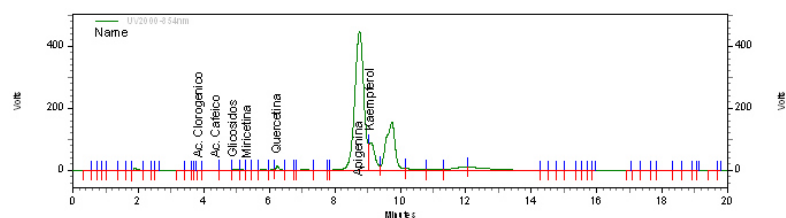
**Cromatograma de *P. sativum* fresco (control).**



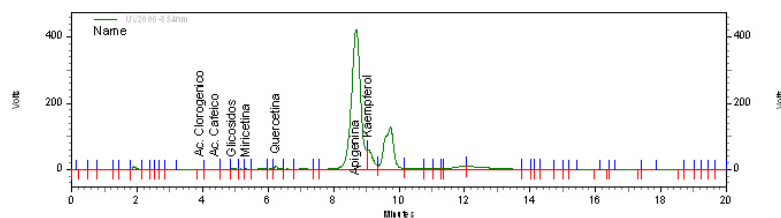
**Cromatograma de *P. sativum* tratamiento térmico por inmersión durante 1 minuto.**



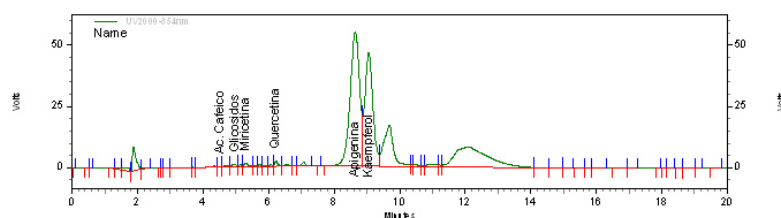
**Cromatograma de *P. sativum* tratamiento térmico por inmersión durante 5 minutos.**



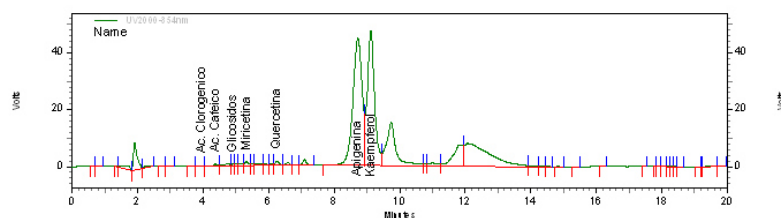
**Cromatograma de *P. sativum* tratamiento térmico por inmersión durante 15 minutos.**



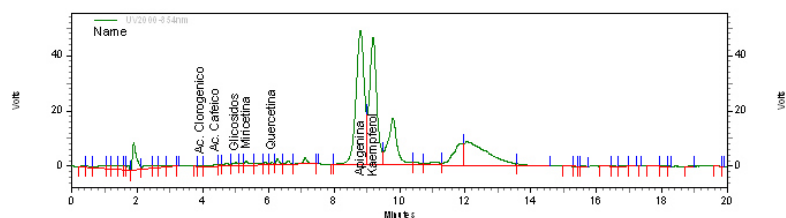
**Cromatograma de *P. sativum* tratamiento térmico por inmersión durante 30 minutos.**



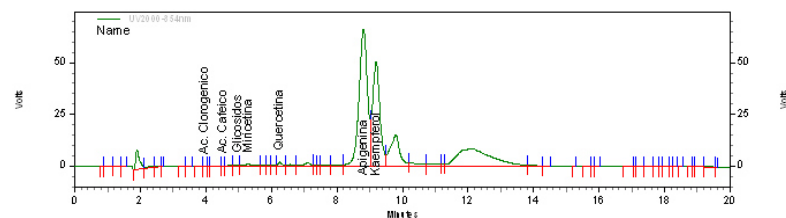
**Cromatograma de *P. sativum* tratamiento térmico por vapor durante 5 minutos.**



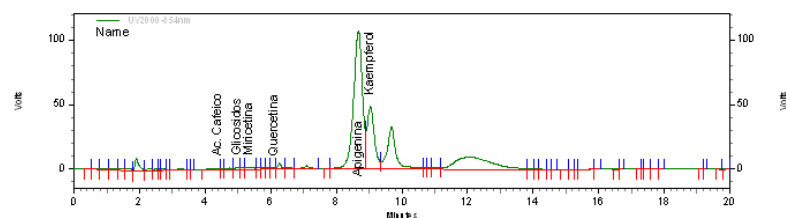
**Cromatograma de *P. sativum* tratamiento térmico por vapor durante 15 minutos.**



**Cromatograma de contenido de apigenina y kaempferol en *P. sativum* tratamiento térmico por vapor durante 30 minutos.**



**Cromatograma de contenido de apigenina y kaempferol en *P. crispum* en senescencia.**



**Cromatograma de contenido de apigenina y kaempferol en *P. sativum* en senescencia.**